

Université de Montréal

Développement d'une méthode de production de vésicules membranaires
permettant l'étude du mode d'action des toxines insecticides de *Bacillus*
thuringiensis

Par Maxime Schmidt

Département de physique, Faculté des arts et des sciences

Mémoire déposé en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Physique,
option biophysique et physiologie moléculaire

Décembre 2016

©Maxime Schmidt, 2016

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé :

Développement d'une méthode de production de vésicules membranaires
permettant l'étude du mode d'action des toxines insecticides de *Bacillus*
thuringiensis

présenté par :
Maxime Schmidt

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Louis Schwartz
Directeur de recherche

Raynald Laprade
Membre du jury

Rikard Blunck
Président du jury

Résumé

La plupart des toxines de *Bacillus thuringiensis* perméabilisent la membrane intestinale des insectes sensibles en formant des pores qui abolissent le potentiel électrique et les gradients ioniques. Plusieurs toxines ont été étudiées avec des vésicules purifiées de la bordure en brosse intestinale des insectes. Malheureusement, la membrane intestinale de beaucoup d'insectes ne forme pas des vésicules suffisamment étanches pour les expériences de perméabilisation. Une nouvelle technique utilisant des liposomes géants et une sonde de perméabilité membranaire a été développée pour caractériser deux nouvelles toxines particulièrement prometteuses pour le biocontrôle d'un des principaux ravageurs du maïs, la chrysomèle des racines du maïs (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte), Cry6Aa1 et la toxine binaire DS10/DS11. Les deux toxines perméabilisent efficacement les liposomes. La toxine binaire forme des pores qui sont légèrement sélectifs pour les cations, comme la plupart des toxines de *B. thuringiensis*. Bien que la Cry6Aa1 puisse former des pores sélectifs pour les anions, les résultats suggèrent aussi qu'elle pourrait, contrairement aux autres toxines de cette bactérie, ne former des pores qu'en présence d'une force ionique élevée. La formation des pores par ces deux toxines semble être sensible à la courbure de la membrane cible étant donné qu'elle est beaucoup plus efficace dans des liposomes géants que dans des liposomes de même composition, mais plus petits. Ce travail jette les bases de la mise au point d'une technique qui permettrait l'étude des toxines dans des liposomes géants enrichis avec des protéines et des lipides provenant de la membrane intestinale des insectes cibles.

Mots clés : Cry6Aa1, toxine binaire DS10/DS11, formation de pores, liposomes géants, carboxyfluorescéine, *Bacillus thuringiensis*, chrysomèle des racines du maïs, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte

Abstract

Most *Bacillus thuringiensis* toxins permeabilize the intestinal membrane of susceptible insects by forming pores that abolish transmembrane electrical potentials and ionic gradients. Several toxins have been studied using brush border membrane vesicles purified from the insect midgut. Unfortunately, the intestinal membrane from many insects does not form vesicles that are tight enough to be used in permeabilisation experiments. A new technique using giant liposomes and a membrane permeability probe was developed to evaluate the pore-forming ability of two particularly promising toxins for the biocontrol of a major corn pest, the Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte), Cry6Aa1 and the binary toxin DS10/DS11. Both toxins permeabilized the liposomes efficiently. However, analysis of the permeabilisation rates under different experimental conditions indicates that these toxins differ in their biophysical properties. The binary toxin forms pores which are slightly selective for cations, like most *B. thuringiensis* toxins. On the other hand, although the results suggest that Cry6Aa1 could form anion-selective pores, they could also indicate that, in contrast with other toxins produced by this bacterium, it could form pores only under high ionic strength conditions. Pore formation by both toxins appears to be sensitive to membrane curvature since it is much more efficient in giant liposomes than in liposomes with identical composition, but smaller in size. This study sets the bases for the development of a technique that would allow the toxins to be studied in giant liposomes enriched with proteins and lipids from the intestinal membrane of target insects.

Key words: Cry6Aa1, DS10/DS11 binary toxin, pore formation, giant liposomes, carboxyfluorescein, *Bacillus thuringiensis*, Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Table des matières	iii
Liste des figures.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des abréviations	viii
Remerciements	ix
1. Introduction	1
1.1. Toxines formeuses de pores.....	1
1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
1.2.1. Histoire.....	3
1.2.2. Nomenclature des toxines de <i>B. thuringiensis</i>	4
1.2.3. Mode d'action.....	6
1.2.3.1. Ingestion	7
1.2.3.2. Solubilisation	7
1.2.3.3. Activation	8
1.2.3.4. Traversée de la membrane péritrophique	9
1.2.3.5. Récepteurs membranaires.....	9
1.2.3.5.1. Aminopeptidase N.....	10
1.2.3.5.2. Phosphatase alcaline.....	10
1.2.3.5.3. Cadhérines	11
1.2.3.5.4. Glycolipides.....	11
1.2.3.5.5. Transporteurs ABC	12
1.2.3.6. Formation de pores	12
1.2.4. Structure	14
1.2.4.1. Toxines à trois domaines	14
1.2.4.1.1. Protoxine Cry1Ac1	17
1.2.4.1.2. Cry6Aa1.....	18
1.2.4.1.3. Toxine binaire Cry34Ab1/Cry35Ab1.....	20
1.2.4.1.4. Parasporines.....	21
1.2.4.1.5. Cyt1Aa1.....	22
1.2.4.1.6. Vip2	24
1.3. <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> LeConte et <i>Diabrotica barberi</i>	25
1.3.1. Toxines Cry pouvant contrôler <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> LeConte	27
1.3.1.1. Cry6Aa1.....	27
1.3.1.2. Toxines DS10, DS11, DS12.....	28
1.4. Hypothèses.....	28
1.5. Objectifs.....	29
2. Matériel et méthodes	30
2.1. Produits chimiques.....	30
2.2. Préparation des toxines	30
2.3. Extraction du suc intestinal des larves de la chrysomèle	32
2.4. Traitement de la Cry6Aa1 avec du suc intestinal de la chrysomèle	33
2.5. Traitement de la Cry6Aa1 avec la trypsine	34

2.6.	<i>Matériel de la bordure en brosse intestinale</i>	34
2.7.	<i>Sonde fluorescente</i>	35
2.7.1.	Préparation	35
2.7.2.	Propriétés.....	35
2.8.	<i>Liposomes géants</i>	37
2.9.	<i>Préparation de grands liposomes unilamellaires par extrusion</i>	38
2.10.	<i>Microphotographie</i>	38
2.11.	<i>Mesures de fluorescence</i>	39
2.12.	<i>Normalisation des données</i>	39
2.13.	<i>Autres mesures de perméabilité membranaire</i>	40
3.	Résultats	41
3.1.	<i>Comparaison de différentes méthodes de préparation de liposomes</i>	41
3.1.1.	Grands liposomes unilamellaires	41
3.1.2.	Liposomes géants.....	43
3.2.	<i>Cry6Aa1</i>	46
3.2.1.	Effet du cholestérol	54
3.2.2.	Effet de la protéolyse	56
3.3.	<i>Toxine binaire DS10/DS11 et DS12</i>	58
4.	Discussion	68
4.1.	<i>Mécanisme d'efflux de la carboxyfluorescéine</i>	69
4.2.	<i>Propriétés des pores formés par les toxines</i>	71
4.2.1.	Cry6Aa1	72
4.2.2.	DS10/11	78
4.3.	<i>Perspectives</i>	79
5.	Références	81

Liste des figures

Figure 1 Représentation du système de classification des toxines Cry	5
Figure 2 Étapes du mode d'action classique menant à la mort de l'insecte	6
Figure 3 Cry1Ac1 (4W8J) subissant une protéolyse (4ARX).....	8
Figure 4 Structure de la Cry3Aa1 (1DLC) (A) et de la Cry1Aa1 (1CIY) (B).....	16
Figure 5 Structure de la Cry1Ac1 native (4W8J)	17
Figure 6 Structure de la Cry6Aa1 (5KUC)	19
Figure 7 Structure de la Cry34Ab1 (4JOX) (A) et de la Cry35Ab1 (4JP0) (B)	21
Figure 8 Structure de la Parasporine 2 (2ZTB)	22
Figure 9 Structure de la Cyt1Aa1 (3RON)	23
Figure 10 Structure de Vip2 (1QS1)	25
Figure 11 Électrophorèse de la Cry6Aa1.....	31
Figure 12 Les différentes formes moléculaires que la 6-carboxyfluorescéine peut prendre.....	36
Figure 13 Morphologie de liposomes géants préparés avec 100% de phosphatidylcholine	45
Figure 14 Morphologie de liposomes géants préparés avec 90% de phosphatidylcholine et 10% de phosphatidylglycérol.....	46
Figure 15 Effet de la concentration de la forme native de la toxine Cry6Aa1 sur la perméabilité de liposomes géants	47
Figure 16 Effet de la composition du milieu extravésiculaire sur la capacité de la forme native de la Cry6Aa1 à perméabiliser des liposomes géants	49
Figure 17 Effet de la valinomycine sur la perméabilité des liposomes géants.....	52
Figure 18 Comparaison de la capacité de la forme native de la Cry6Aa1 à perméabiliser des grands liposomes unilamellaires, préparés avec la technique d'extrusion, et des liposomes géants.....	53
Figure 19 Effet de la valinomycine sur la perméabilité des liposomes préparés par extrusion.....	54
Figure 20 Effet du cholestérol sur la capacité de la forme native de la Cry6Aa1 à perméabiliser des liposomes géants	55
Figure 21 Effet du suc intestinal de la chrysomèle sur la capacité de la Cry6Aa1 à perméabiliser des liposomes géants	57
Figure 22 Comparaison la capacité à perméabiliser des liposomes géants de la Cry6Aa1 traitée avec la trypsine et des fragments produits par ce traitement	58
Figure 23 Effet de la concentration de la toxine binaire DS10/DS11 sur la perméabilité de liposomes géants.....	59
Figure 24 Effet de la composition du milieu sur la capacité de la toxine binaire DS10/DS11 à perméabiliser des liposomes géants	61
Figure 25 Comparaison de la capacité de la toxine binaire DS10/DS11 à perméabiliser des grands liposomes unilamellaires, préparés avec la technique d'extrusion, et des liposomes géants.....	62
Figure 26 Effet du cholestérol sur la capacité de la toxine binaire DS10/DS11 à perméabiliser des liposomes géants	63

Figure 27 Comparaison de la capacité des protéines DS10, DS11 et DS12 à former des pores dans des liposomes géants	64
Figure 28 Effet du mélange de la DS10 avec la DS11 ou la DS12 sur la perméabilité des liposomes géants.....	65
Figure 29 Effet d’une incubation prolongée du mélange de la DS10 avec la DS11 ou la DS12 sur leur capacité à perméabiliser les liposomes géants	66
Figure 30 Effet des conditions réductrices sur l’activité de la toxine binaire DS10/DS11 et des mélanges de DS10 et DS11 ou de DS10 et DS12	67
Figure 31 Comparaison de la structure de la Cry6Aa1 (5KUC) (A) et de l’hémolysine E (4PHQ) (B)	77

Liste des tableaux

Tableau I Liste des différentes toxines Cry à trois domaines ayant été cristallisées.....	15
Tableau II Gradients ioniques établis de part et d'autre de la membrane dans les expériences utilisant la carboxyfluorescéine	50

Liste des abréviations

ATP	Adénosine triphosphate
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringensis</i>
Caps	Acide 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonique
CF	5-(6)-carboxyfluorescéine
CHAPS	Acide 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonique
DiS-C ₃ (5)	Iodure de 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
Hepes	Acide N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonique]
K glu	Gluconate de potassium
K ₃ Cit	Citrate de potassium
kDa	kilodalton
NMDGCl	Chlorure de N-méthyl-D-Glucamine
PDB	<i>Proteins data bank</i>
Sip	<i>Secreted insecticidal proteins</i>
TPCK	N-p-tosyl-L-phenylalanine chlorométhyle cétone
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
VIP	<i>Vegetative insecticidal proteins</i>
WCR	<i>Western corn rootworm</i>

Remerciements

J'aimerais remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ma maîtrise.

Premièrement, merci à Jean-Louis Schwartz pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche, pour avoir été mon directeur de maîtrise, pour les bons conseils et encouragements ainsi que pour le financement de mon projet.

Merci à Vincent Vachon pour avoir encadré mon projet durant toute la durée de ma maîtrise, m'avoir montré plusieurs techniques de laboratoire, pour les conseils, idées et encouragements et spécialement pour l'aide lors de l'écriture de mon mémoire.

Merci à James-Christopher Bernard et Eva Fortea Verdejo pour avoir été des collègues fantastiques et de très bons amis. Merci d'avoir organisé plusieurs activités en dehors du laboratoire.

Merci à tous les étudiants qui sont venus faire un stage dans le laboratoire, Daline Tho, Maxime Schmidt, Emilie Huynh et Thomas Cauchi. Vous êtes des personnes fantastiques, et merci d'avoir contribué à la vie du laboratoire.

Je tiens à remercier tous les membres du GÉPROM pour toujours avoir été disponibles afin de m'aider dans ma réussite. Vous m'avez enseigné, montré des techniques que je ne connaissais pas, donné de bons conseils et vous m'avez encouragé.

Merci à Michel Brunette pour avoir réglé de nombreux problèmes techniques et m'avoir ainsi permis de poursuivre mon parcours.

Merci à Raynald Laprade et Michel Lafleur pour les bons conseils lorsque j'avais des questions particulièrement difficiles auxquelles répondre.

Merci à l'équipe de Dow AgroSciences pour la contribution au projet en fournissant les toxines nécessaires aux expériences.

Finalement, je tiens à remercier Laurence Haché et à toute ma famille pour avoir été présents pour moi durant tout ce défi et encouragé tout au long du parcours. Je vous aime profondément.

1. Introduction

La production de toxines qui ont la propriété de former des pores dans leurs membranes cibles constitue un des principaux facteurs de virulence d'un très grand nombre de bactéries pathogènes (Gonzalez et al. 2008; Los et al. 2013; Dal Peraro et van der Goot 2016). Il en va de même pour la bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* (Bt) dont les toxines sont l'ingrédient actif de la majorité des insecticides biologiques utilisés de nos jours pour la protection des cultures (Navon 2000; Sanchis et Bourguet 2008; Sauka et Benintende 2008) et des forêts (van Frankenhuyzen 2000) et pour lutter contre les vecteurs de maladies (Lacey et Undeen 1986; Thiery et al. 1996; Becker 2000) ainsi que de la plupart des plantes transgéniques résistantes aux insectes ravageurs (Cannon 2000; Shelton, Zhao et Roush 2002; Ferré, Van Rie et MacIntosh 2008; James 2015).

1.1. Toxines formeuses de pores

Bien qu'il existe un très grand nombre des toxines formeuses de pores (Gonzalez et al. 2008; Bischofberger, Iacovache et Van Der Goot 2012), la plupart d'entre elles peuvent être regroupées dans six familles selon leurs ressemblances structurales (Dal Peraro et van der Goot 2016). Elles sont d'abord produites sous forme de protéines solubles qui, après s'être fixées à la surface des cellules cibles, s'oligomérisent et s'insèrent dans la membrane pour former des pores. La structure de ces pores varie selon la famille de toxine, mais résulte généralement de l'assemblage d'un groupe d'hélices- α , comme dans le cas des toxines appartenant aux familles des colicines, de la cytolysine A ou des actinoporines, ou de la

formation d'une structure en baril- β , comme dans le cas des toxines de la famille des hémolysines, de l'aérolysine ou des cytolysines dépendantes du cholestérol (Dal Peraro et van der Goot 2016). L'apparition de pores dans la membrane plasmique de la cellule abolit son potentiel membranaire et déstabilise ses gradients chimiques, ce qui entraîne, entre autres choses, l'épuisement des réserves cellulaires d'ATP (adénosine triphosphate), la mort et éventuellement, selon les conditions osmotiques du milieu environnant, la lyse de la cellule.

1.2. *Bacillus thuringiensis*

Comme les autres membres du genre *Bacillus*, *B. thuringiensis* est une bactérie aérobie à Gram positif qui prend la forme d'une spore lorsque les conditions du milieu environnant se détériorent. La spore, dans laquelle l'ADN de la bactérie est emmagasiné, lui permet de résister très longtemps aux conditions environnementales défavorables. Ce qui distingue *B. thuringiensis* des autres espèces du même genre est la présence de cristaux qui s'accumulent à côté de la spore pendant le processus de sporulation (Bulla et al. 1980; Whiteley et Schnepf 1986). Ces cristaux parasporaux sont constitués de protéines qui ont souvent des propriétés insecticides (toxines Cry et Cyt) (Höfte et Whiteley 1989; Raymond et al. 2010). La bactérie produit aussi des toxines insecticides pendant la phase de croissance végétative (toxines Vip (*Vegetative insecticidal proteins*) et Sip (*Secreted insecticidal proteins*)). Plusieurs centaines de toxines produites par différentes souches de *B. thuringiensis* ont été caractérisées jusqu'à présent et leur nombre ne cesse d'augmenter (van Frankenhuyzen 2009; Crickmore et al. 2016).

1.2.1. Histoire

L'histoire de l'utilisation de *B. thuringiensis* et de ses toxines comme insecticide a souvent été racontée (Beegle et Yamamoto 1992; Lecadet 1996; Federici 2005; Bravo et al. 2011; Sanahuja et al. 2011; Sanchis 2011). La première souche de cette bactérie a été découverte en 1901 par Shigetane Ishiwata dans le cadre de ses travaux sur la cause de la flacherie (ou maladie de sotto en japonais) qui faisait alors des ravages très importants sur de grandes populations de vers à soie. Il a réussi à isoler la souche bactérienne responsable et l'a nommée *Bacillus sotto*. Cette bactérie a été découverte indépendamment en 1911 par Ernst Berliner en Thuringe, une région du centre de l'Allemagne. C'est pourquoi il lui a donné le nom de *Bacillus thuringiensis*, ou bacille de Thuringe, qui s'est peu à peu imposé par la suite. La souche responsable de la flacherie s'appelle maintenant *Bacillus thuringiensis* variété *sotto*. En 1915, Berliner observa la présence de cristaux de protéines à l'intérieur de cette bactérie, mais il fallut attendre 1954 pour la démonstration que ces cristaux sont responsables de sa virulence (Angus 1954; Angus 1956). Depuis 1920, différentes souches du bacille de Thuringe sont utilisées comme insecticide (Beegle et Yamamoto 1992), et la première plante exprimant une toxine de cette bactérie a été enregistrée auprès de l'*Environmental Protection Agency* américaine en 1995 (Sanchis 2011). Aujourd'hui, plusieurs milliers de souches de *B. thuringiensis* ont été isolées, et les plantes transgéniques exprimant un ou plusieurs gènes codant pour ses toxines occupent une part toujours grandissante du marché (Ferré et al. 2008; James 2015).

1.2.2. Nomenclature des toxines de *B. thuringiensis*

Les toxines de *B. thuringiensis* se distinguent des insecticides de synthèse du fait que chacune d'entre elles agit très spécifiquement sur un nombre restreint d'organismes cibles. Collectivement, les différentes souches de cette espèce bactérienne produisent néanmoins des toxines qui ciblent un grand nombre d'insectes appartenant principalement aux ordres des lépidoptères, des diptères et des coléoptères (Schnepf et al. 1998; de Maagd et al. 2003), mais aussi des nématodes (Wei et al. 2003). Certaines toxines Cry, appelées parasporines, sont même capables de tuer préférentiellement des cellules cancéreuses en culture (Ohba, Mizuki et Uemori 2009).

Devant une telle complexité, plusieurs systèmes de classification ont été utilisés. Pendant plusieurs décennies, les souches de *B. thuringiensis* étaient classées selon leurs antigènes flagellaires (de Barjac et Bonnefoi 1962; de Barjac et Frachon 1990; Lecadet et al. 1999). Il est cependant devenu progressivement clair que la virulence d'une souche donnée dépendait des toxines qu'elle produit et que celles-ci ne corrèlent pas toujours avec les antigènes exprimés à la surface de la cellule bactérienne. Le clonage des gènes codant pour les toxines du bacille de Thuringe, réussi pour la première fois par Schnepf et Whiteley (1981), a ouvert la voie à la mise au point de systèmes efficaces de classification de ces toxines. Le premier de ces systèmes reposait à la fois sur l'homologie de séquence des toxines et sur leurs propriétés insecticides. Les toxines étaient d'abord regroupées par familles selon l'ordre (ou, dans certains cas, les ordres) d'insectes qu'elles ciblaient (Höfte et Whiteley 1989). Avec l'accroissement très rapide du nombre de toxines caractérisées, ce système s'est vite avéré

trop compliqué d'application. Il a donc été modifié pour ne tenir compte que de l'identité de la séquence des acides aminés des toxines (Crickmore et al. 1998) (Figure 1). Bien que le classement des toxines ne dépende plus des organismes qu'elles ciblent, seules les protéines ayant une toxicité démontrée envers un organisme vivant, ou une très grande homologie de séquence avec une toxine reconnue, sont incluses dans la classification. Ce nouveau système attribue quatre caractères aux toxines des familles Cry, Cyt, Vip et Sip.

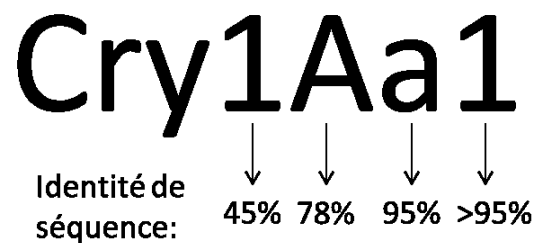


Figure 1 Représentation du système de classification des toxines Cry

C'est ainsi qu'on assigne un chiffre différent, en première position, aux toxines dont l'identité de séquence est inférieure à 45%, une lettre majuscule différente, en deuxième position, à celles pour lesquelles elle se situe entre 45 et 78%, une lettre minuscule différente, en troisième position, lorsqu'elle se situe entre 78 et 95%, et enfin un chiffre différent, en quatrième position, pour distinguer les toxines dont la séquence est identique à plus de 95% (Crickmore et al. 1998). Une liste, tenue régulièrement à jour, des toxines du bacille de Thuringe et de leurs séquences est disponible sur internet (Crickmore et al. 2016).

1.2.3. Mode d'action

Puisque l'histoire de l'utilisation des insecticides à base de *B. thuringiensis* est longue, de nombreux groupes de recherche ont étudié le mode d'action des toxines produites par cette bactérie (Aronson et Shai 2001; Whalon et Wingerd 2003; Chattopadhyay, Bhatnagar et Bhatnagar 2004; Jurat-Fuentes et Adang 2006; Federici, Park et Bideshi 2010; Soberón et al. 2010; Pardo-López, Soberón et Bravo 2013). Il existe plusieurs modèles qui tentent d'expliquer le mode d'action des toxines Cry (Vachon, Laprade et Schwartz 2012). Le modèle classique (Figure 2), ayant été le plus étudié, représente une suite d'événements qui est bien comprise (Rajamohan et al., 1998; Schnepf et al., 1998).

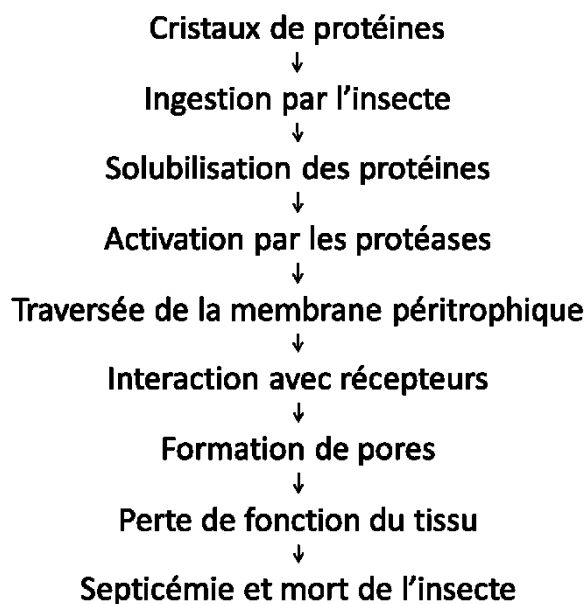


Figure 2 Étapes du mode d'action classique menant à la mort de l'insecte

1.2.3.1. Ingestion

Les toxines du bacille de Thuringe agissent au niveau des cellules intestinales de l'organisme ciblé. Elles doivent donc d'abord être ingérées par celui-ci. Si cette nécessité ne pose pas de problème pour le biocontrôle de nombreux insectes, il en va autrement pour ceux qui se nourrissent des racines ou qui se logent à l'intérieur du tissu de leur plante hôte. L'épandage d'insecticide à la surface de la plante ne saurait alors la protéger, mais cette difficulté peut être contournée en exprimant les toxines directement dans la plante. Cette constatation explique en grande partie pourquoi l'utilisation de maïs et de coton transgéniques a pris une si grande ampleur un peu partout dans le monde (Ferré et al. 2008; James 2015).

1.2.3.2. Solubilisation

Une fois ingérés, les cristaux se solubilisent dans l'intestin. Pour de nombreuses toxines Cry, les cristaux sont stabilisés par des liens disulfure intermoléculaires reliant la partie C-terminale, particulièrement riche en cystéines, de ces protéines (Bietlot et al. 1990). Les conditions réductrices, ainsi que le pH et la force ionique souvent élevés du milieu intestinal (Dow 1987) favorisent la rupture de ces ponts disulfure et la solubilisation de la toxine (Knowles et Dow 1993; Knowles 1994). Par contre, pour certaines toxines, comme la Cry3Aa1 (Koller, Bauer et Hollingworth 1992) et la Cry6Aa1 (Forte et al. 2016), qui sont actives contre différentes espèces de coléoptères, le mécanisme de solubilisation apparaît plus complexe, et plutôt mal compris, puisque ces toxines ne se solubilisent qu'à pH inférieur à 4 ou

supérieur à 10, même si le pH intestinal des coléoptères se situe entre 4,5 et 6,6 (Dow 1987; Kaiser-Alexnat 2009).

1.2.3.3. Activation

Une fois solubilisées, les toxines doivent être activées. Cette étape consiste en une protéolyse, ou digestion, par les différentes enzymes intestinales. Selon la taille de sa forme native, la protoxine est transformée en une protéine active, de plus faible poids moléculaire résistante aux protéases, par l'hydrolyse d'un segment plus ou moins long de sa structure primaire (Schnepf et al. 1998; Oppert 1999) (Figure 3). L'activité biologique de la toxine peut dépendre de l'enzyme avec laquelle la protoxine a été digérée (Haider, Knowles et Ellar 1986; Ogiwara et al. 1992; Smedley, Armstrong et Ellar 1997; Miranda, Zamudio et Bravo 2001). De plus, une modification de l'activité enzymatique de l'insecte peut entraîner la résistance aux toxines de *B. thuringiensis* (Oppert et al. 1994; González-Cabrera et al. 2013; Pardo-López et al. 2013).

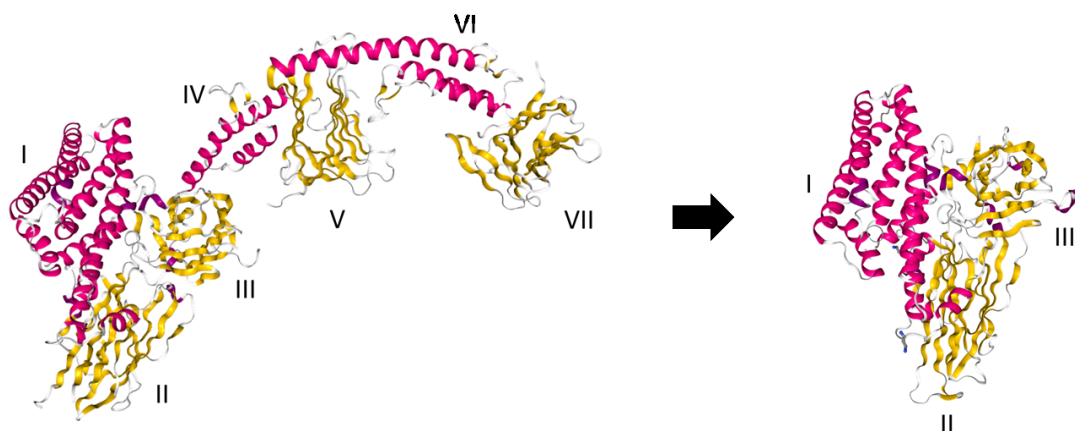


Figure 3 Cry1Ac1 (4W8J) subissant une protéolyse (4ARX)

1.2.3.4. Traversée de la membrane péritrophique

Une fois que la toxine a été solubilisée et activée, elle doit traverser une barrière, la membrane péritrophique, avant de pouvoir atteindre la paroi de l'intestin et s'y insérer. Cette membrane est constituée principalement de chitine et de glycoprotéines formant un maillon relativement serré (Richards et Richards 1977; Lehane 1997; Terra 2001). Elle sert à protéger l'intestin de l'insecte des morceaux de nourriture et des microorganismes. Bien que les toxines soient assez petites pour passer à travers les maillons de la membrane péritrophique, celle-ci, combinée avec la présence de protéases qui peuvent détruire les toxines, constitue un obstacle qui entrave leur passage (Rees, Jarrett et Ellar 2009). L'importance de ce facteur est illustré par l'observation maintes fois relatée d'un effet synergique de l'administration conjointe de chitinase, une enzyme qui dégrade la chitine, qu'elle soit exogène ou produite par le bacille de Thuringe, et de ses toxines (Smirnoff 1971, 1977; Regev et al. 1996; Sampson et Gooday 1998; Liu et al. 2002).

1.2.3.5. Récepteurs membranaires

La toxine activée interagit avec la membrane apicale à bordure en brosse des cellules intestinales de l'insecte en se fixant d'abord à des récepteurs spécifiques. La présence de tels sites de liaison sur la surface membranaire a été mise en évidence par des expériences de fixation de toxines marquées à l'iode radioactif sur des vésicules de la membrane intestinale (Hofmann et al. 1988a, b; Van Rie et al. 1989, 1990). Cette fixation, déterminante pour la spécificité des effets de la toxine, mais encore réversible, est rapidement suivie par une

étape de fixation irréversible correspondant à l'insertion de la toxine dans la membrane (Liang, Patel et Dean 1995). Depuis ces premiers travaux, la fixation des toxines sur leur membrane cible a fait l'objet d'une activité de recherche considérable qui a permis d'identifier plusieurs protéines membranaires qui agissent comme récepteurs des toxines du bacille de Thuringe (Gómez et al. 2007; Pigott et Ellar 2007; Likitvivatanavong et al. 2011).

1.2.3.5.1. Aminopeptidase N

La famille des aminopeptidases N est abondante au niveau de la membrane à bordure en brosse intestinale des insectes. Ces enzymes, ancrées dans la membrane par un groupement glycosylphosphatidylinositol, contribuent à la digestion des protéines en libérant l'acide aminé situé à l'extrémité N-terminale des peptides. En plus d'avoir la capacité de fixer spécifiquement un certain nombre de toxines Cry (Knight, Crickmore et Ellar 1994; Knight, Knowles et Ellar 1995; Valaitis et al. 1995; Denolf et al. 1997), certaines isoformes de cette famille de protéases peuvent stimuler considérablement la fuite, induite par la Cry1Ac, de rubidium radioactif emprisonné dans des liposomes (Sangadala et al. 1994) et la formation de pores, par les toxines Cry1Aa, Cry1Ac et Cry1Ca, dans des bicouches lipidiques planes (Schwartz et al. 1997a).

1.2.3.5.2. Phosphatase alcaline

Une autre protéine ancrée dans la membrane intestinale par un groupement glycosylphosphatidylinositol, la phosphatase alcaline, en plus de jouer son rôle dans la digestion en hydrolysant les groupements phosphate des protéines et des nucléotides, agit

comme récepteur de certaines toxines Cry (Jurat-Fuentes et Adang 2004; Fernandez et al. 2006, 2009). Une diminution des niveaux de phosphatase alcaline est souvent observée chez les insectes qui ont acquis une résistance à ces toxines (Jurat-Fuentes et al. 2011).

1.2.3.5.3. Cadhérines

Les cadhérines sont des protéines membranaires caractérisées par la présence de plusieurs sites de fixation du calcium dans leur structure. Elles jouent principalement un rôle important dans l'adhésion des cellules et l'organisation des tissus (Maître et Heisenberg 2013). Chez les insectes, des protéines de ce type se retrouvent dans la membrane apicale des cellules intestinales où leur rôle biologique reste à préciser, mais certaines d'entre elles servent de récepteurs à plusieurs toxines Cry. La première d'entre elles à avoir été identifiée et clonée, BT-R₁, est une protéine de 210 kDa du sphinx du tabac, *Manduca sexta* (Vadlamudi, Ji et Bulla 1993). Contrairement aux récepteurs de type aminopeptidase N, BT-R₁ a pu s'exprimer correctement dans des lignées cellulaires (Vadlamudi et al. 1995), ce qui a permis de démontrer que les cadhérines peuvent fixer des toxines Cry1A et rendre les cellules dans lesquelles elles sont exprimées sensibles à ces toxines (Dorsch et al. 2002; Hua, Jurat-Fuentes, et Adang 2004a, b; Zhang et al. 2005).

1.2.3.5.4. Glycolipides

La capacité de certaines toxines Cry de se lier avec des glycolipides de la membrane intestinale des insectes a été notée depuis longtemps (Garczynski, Crim et Adang 1991; Pigott et Ellar 2007), mais le rôle de cette interaction dans le mécanisme d'action des toxines

est encore loin d'être établi. Il en va tout autrement pour les nématodes, chez qui certains glycolipides agissent clairement comme récepteurs de la toxine Cry5B (Griffitts et al. 2005). Après avoir isolé plus de 200 lignées de *Caenorhabditis elegans* résistantes à cette toxine, Griffitts et al. (2003, 2005) ont en effet pu mettre en évidence que la résistance était due à la mutation de l'un ou l'autre de quatre gènes codant pour des enzymes jouant un rôle essentiel dans la synthèse des glycolipides.

1.2.3.5.5. Transporteurs ABC

On retrouve couramment des transporteurs ABC (*ATP binding cassette transporters*) chez les procaryotes et les eucaryotes. Ils transportent différentes molécules au travers des membranes cellulaires en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. Ces protéines n'étaient pas considérées comme jouant un rôle dans la toxicité des toxines Cry jusqu'à ce que des études récentes démontrent que certaines mutations responsables de la résistance de *Heliothis virescens* à la toxine Cry1Ab se trouvent dans un gène codant pour l'un de ces transporteurs (Gahan et al. 2010). De plus, l'expression du gène codant pour le transporteur correspondant, mais provenant du ver à soie, *Bombyx mori*, dans des cellules Sf9 a rendu ces cellules sensibles aux toxines Cry1Ab et Cry1Ac, mais ce ne fut pas le cas lorsqu'une mutation était présente dans le gène exprimé (Tanaka et al. 2013).

1.2.3.6. Formation de pores

L'interaction des toxines avec leur membrane cible entraîne leur oligomérisation et la formation de pores transmembranaires peu sélectifs qui laissent passer les petites molécules

comme les ions inorganiques, les acides aminés et les petits sucres (Carroll et Ellar 1993; Kirouac et al. 2002). Le potentiel membranaire est alors aboli, et il peut se produire une lyse cellulaire due à l'entrée massive de solutés provenant de la lumière intestinale (Knowles et Ellar 1987). Puisque les cellules du tissu intestinal sont abimées, l'insecte n'arrive plus à se nourrir. De plus, la flore intestinale peut alors envahir l'hémolymph et, peu à peu, tout l'organisme, ce qui entraîne une septicémie et la mort de la larve.

Parce qu'elle constitue une étape cruciale dans le mode d'action des toxines Cry, la formation des pores a été étudiée de façon très détaillée avec une variété de techniques biophysiques dont, entre autres, des mesures de courant dans des bicouches lipidiques planes, en présence (Schwartz et al. 1997a; Peyronnet et al. 2001) ou en absence (Slatin, Abrams et English 1990; Schwartz et al. 1993; Walters et al. 1993; Grochulski et al. 1995; Peyronnet et al. 2002; Groulx, Juteau et Blunck 2010) de récepteur membranaire dans la bicouche, et des études de *patch-clamp* (Schwartz et al. 1991; Peyronnet et al. 2004). Les effets des toxines sur la perméabilité membranaire de vésicules de la membrane à bordure en brosse intestinale d'insectes ont aussi fait l'objet de nombreuses expériences de gonflement osmotique, évalué avec des mesures d'intensité de la lumière diffusée (Carroll et Ellar 1993; Cux et al. 2001; Tran et al. 2001), ainsi que des mesures de potentiel membranaire évalué avec la sonde fluorescente diS-C₃(5) (iodure de 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine) (Kirouac et al. 2003). Malgré ces études, le mécanisme de pénétration des toxines de *Bacillus thuringiensis* dans les membranes lipidiques n'est pas complètement expliqué. Plusieurs modèles sont utilisés pour tenter d'expliquer ce

mécanisme complexe. L'article de Vachon et al. (2012) est un excellent article de synthèse sur les principaux modèles.

1.2.4. Structure

La majorité des toxines Cry dont la structure est connue possède trois domaines une fois activées. Plusieurs toxines Cry ont été cristallisées et leur structure a alors pu être résolue grâce à la diffraction de rayons X. D'autres toxines n'ont pas pu être cristallisées et différents modèles numériques permettent d'avoir une idée approximative de leur structure. Toutes les structures présentées dans ce travail affichent leurs feuillets β en jaune, leurs hélices α en violet et les chaînes flexibles en gris pâle.

1.2.4.1. Toxines à trois domaines

Dans ce groupe de toxines, la taille varie considérablement d'une famille à l'autre (Tableau I). Plusieurs toxines, comme la Cry1Aa1, forment une protoxine d'environ 130-140 kDa qui devient une toxine activée d'environ 65 kDa (Grochulski et al. 1995; Schnepf et al. 1998). D'autres, comme la Cry2Aa1, sont plus courtes, mais ne doivent pas être clivées pour être actives (Morse, Yamamoto et Stroud 2001). La forme activée de toutes les protéines de ce groupe possède un poids moléculaire d'environ 60-70 kDa et trois domaines très similaires (Xu et al. 2014; Palma et Berry 2016). Il y a au plus 10 kDa de différence entre toutes ces toxines une fois activées.

Tableau I Liste des différentes toxines Cry à trois domaines ayant été cristallisées

Toxine	Organismes Ciblés	Taille (kDa)	Résolution (Å)	Identification PDB ⁽¹⁾	Références
Cry1Aa1	Lépidoptères	65	2,25	1CIY	Grochulski et al. 1995
Cry1Ac1	Lépidoptères	65	2,35	4ARX	Li et al. 2001
Cry1Ac1 (protoxine)	Lépidoptères	130	3,2	4W8J	Evdokimov et al. 2014
Cry2Aa1 (protoxine)	Lépidoptères / Coléoptères	62	2,2	1L5P	Morse, Yamamoto, et Stroud 2001
Cry3Aa1	Coléoptères	67	2,5	1DLC	Li, Carroll, et Ellar 1991
Cry3Bb1	Coléoptères	67,2	2,4	1JI6	Galitsky et al. 2001
Cry4Aa1	Diptères	65	2,8	2C9K	Boonserm et al. 2006
Cry4Ba1	Diptères	68	1,75	1W99	Boonserm et al. 2005
Cry5Ba1	Nématodes	66,1	2,3	4D8M	Hui et al. 2012
Cry8Ea1	Coléoptères	66,2	2,2	3EB7	Guo et al. 2009
Cry31Aa1	Cellules cancéreuses	15+56	1,76	N/A	Akiba et Okumura 2016

⁽¹⁾ Protein data bank

La première toxine à avoir été cristallisée est la Cry3Aa1 (Li, Carroll, et Ellar 1991) (Figure 4A). Sa structure a été élucidée avec une résolution de 2,5 Å. Quelques années plus tard, une seconde structure cristalline a été publiée. Cette fois, la toxine était la Cry1Aa1 et la résolution était de 2,25 Å (Grochulski et al. 1995) (Figure 4B). Bien que les deux toxines ciblent des insectes appartenant à des ordres différents, les trois domaines sont très similaires.

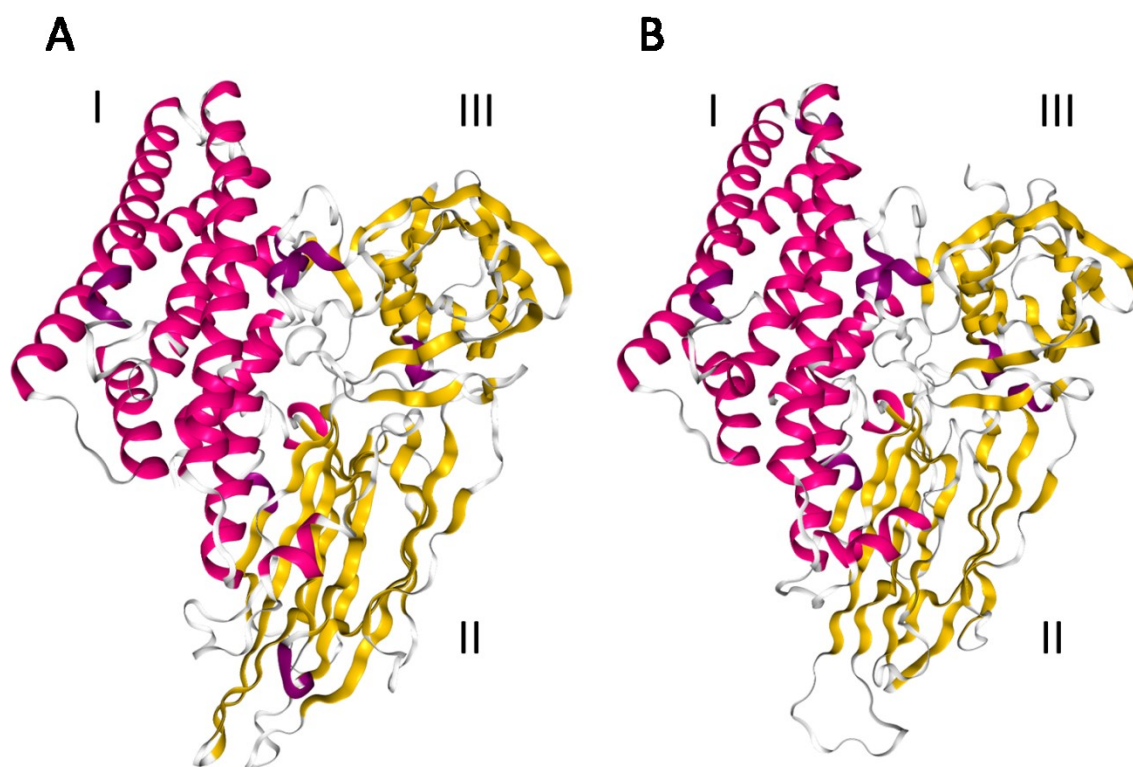


Figure 4 Structure de la Cry3Aa1 (1DLC) (A) et de la Cry1Aa1 (1CIY) (B)

Le rôle de chacun de ces domaines dans le mécanisme d'insertion de la toxine dans la membrane et la formation des pores a fait l'objet d'un très grand nombre de travaux mettant à profit la mutagenèse dirigée et une variété de méthodes biochimiques et biophysiques d'analyse. En résumé, le domaine I, composé de sept hélices α , est celui qui est responsable de la formation des pores (Li, Carroll, et Ellar 1991; Grochulski et al. 1995). Ce domaine, même isolé du reste de la molécule de Cry1Ac (Walters et al. 1993) ou de Cry3Aa (Schwartz et Laprade 2000), est capable de former des pores dans des bicouches lipidiques planes. Le domaine II est constitué de plusieurs feuillets β , et les boucles qui les relient jouent un rôle déterminant dans la reconnaissance des récepteurs membranaires et par conséquent dans la spécificité de la toxine (Rajamohan et al. 1998; Pigott et Ellar 2007). Le domaine III,

également constitué de plusieurs feuillets β , contribue à la stabilité de la toxine et à sa spécificité (de Maagd et al. 1996, 1999). Des mutations dans ce domaine peuvent même entraîner des modifications dans les propriétés des pores formés par la toxine (Schwartz et al. 1997b; Masson et al. 2002)

1.2.4.1.1. Protoxine Cry1Ac1

La structure de la Cry1Ac1 dans sa forme native a été élucidée avec une résolution variant entre 3,2 et 3,5 Å selon les sections (Figure 5) (Evdokimov et al. 2014). Elle possède sept domaines. Les domaines I à III correspondent au fragment actif contre les insectes et les domaines IV à VII correspondent au fragment qui subit une protéolyse lors de l'activation.

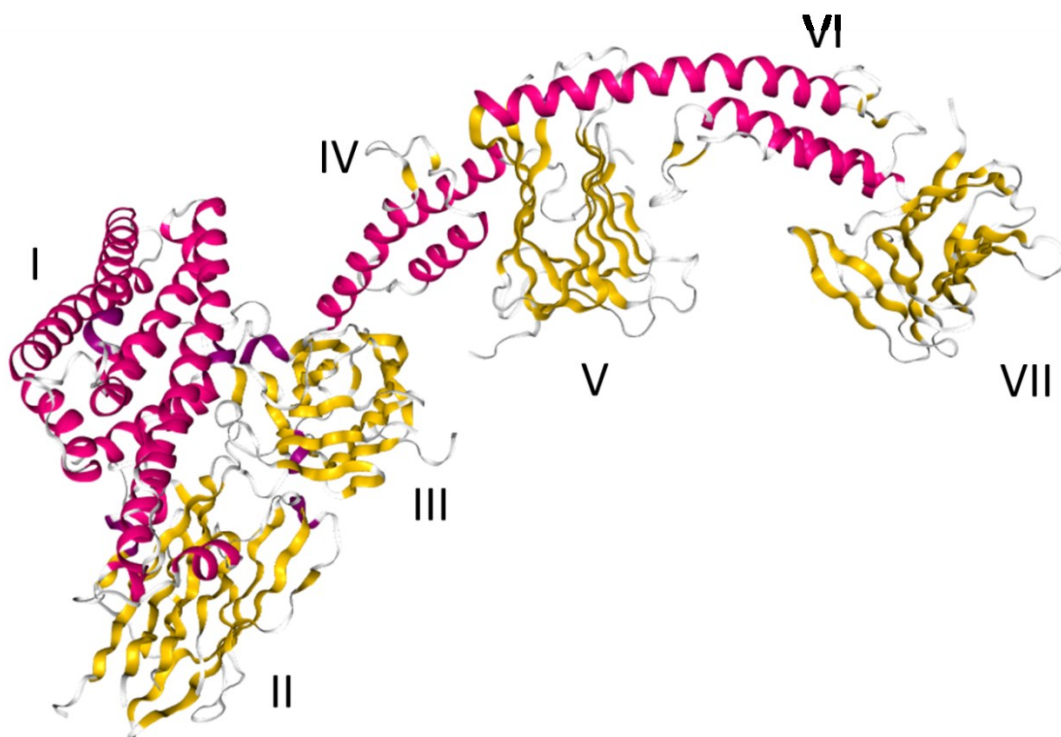


Figure 5 Structure de la Cry1Ac1 native (4W8J)

Il est important de noter que les domaines I à III subissent peu de changements de conformation lorsque la protoxine est activée. Leur structure est très semblable à celles de la Cry3Aa1 et de la Cry1Aa1 présentées dans la Figure 4. Les domaines IV et VI sont formés par des hélices α et les domaines V et VII sont formés par des feuillets β . Pour réussir à cristalliser cette protéine, le groupe d'Evdokimov (2014) a préparé un mutant de la protoxine en remplaçant les 14 cystéines situées dans la partie C-terminale par des sérines, ne laissant que les deux autres cystéines situées très près de l'extrémité N-terminale, afin de réduire l'agrégation et la précipitation de la protéine solubilisée.

1.2.4.2. Cry6Aa1

Deux groupes différents ont récemment été en mesure de cristalliser la Cry6Aa1, une toxine active à la fois contre certains nématodes et certains coléoptères (Dementiev et al. 2016; Huang et al. 2016). Le groupe de Dementiev a déterminé la structure tridimensionnelle de la forme native avec une résolution de 2,7 Å et celle de la protéine traitée à la trypsine avec une résolution de 2,0 Å. Le groupe de Huang a établi la structure de la protéine traitée à la trypsine avec une résolution de 1,9 Å. La toxine native possède neuf hélices α réparties sur deux domaines distincts (Dementiev et al. 2016) (Figure 6). La toxine trypsinisée est composée de sept hélices α (les hélices α -1 à α -3 sont également séparées en plus petites hélices) également réparties sur deux domaines (Dementiev et al. 2016; Huang et al. 2016). Les deux structures ont montré la présence de quelques feuillets β courts. La protéine native comporte des segments flexibles, et il a été nécessaire d'en modéliser plusieurs parties afin d'obtenir la structure complète (Dementiev et al. 2016). La structure de la Cry6Aa1

ressemble à celle de l'hémolysine E (aussi appelée HlyE, ClyA et SheA) produite par certaines souches d'*Escherichia coli* et plusieurs autres membres de la famille de Enterobacteriaceae (Wallace et al. 2000; Hunt, Green et Artymiuk 2010) et à celles de la composante B de la toxine binaire appelée hémolysine BL (Madegowda et al. 2008) et de la protéine NheA de la toxine tripartite Nhe (Ganash et al. 2013) de *Bacillus cereus*. Puisque cette toxine est différente des toxines à trois domaines, son mode d'action est probablement différents.



Figure 6 Structure de la Cry6Aa1 (5KUC)

1.2.4.3. Toxine binaire Cry34Ab1/Cry35Ab1

Ces deux protéines, plus petites que la plupart des autres toxines Cry, soit 14 kDa pour la Cry34Ab1 et 44 kDa pour la Cry35Ab1, doivent agir ensemble pour exercer leur pleine toxicité. La structure de la Cry34Aa1 (Figure 7A), résolue à 2,15 Å, comporte plusieurs feuillets β qui forment une structure presque plate ayant un seul domaine (Kelker et al. 2014). Cette composante est responsable de l'interaction de la toxine avec la membrane. La structure de la Cry35Ab1 (Figure 7B), résolue à 1,8 Å, comporte deux domaines (Kelker et al. 2014). Le premier comprend plusieurs feuillets β qui forment une région très hydrophobe, et le second, comprend des feuillets β et des hélices α . Ce domaine comporte également des cystéines permettant une oligomérisation. La formation de pores par cette toxine binaire a été démontrée avec des mesures de courant dans des bicouches lipidiques et des mesures d'efflux de calcéine emprisonnée dans des liposomes (Masson et al. 2004). La région hydrophobe vient probablement former le pore dans la membrane (Kelker et al. 2014).

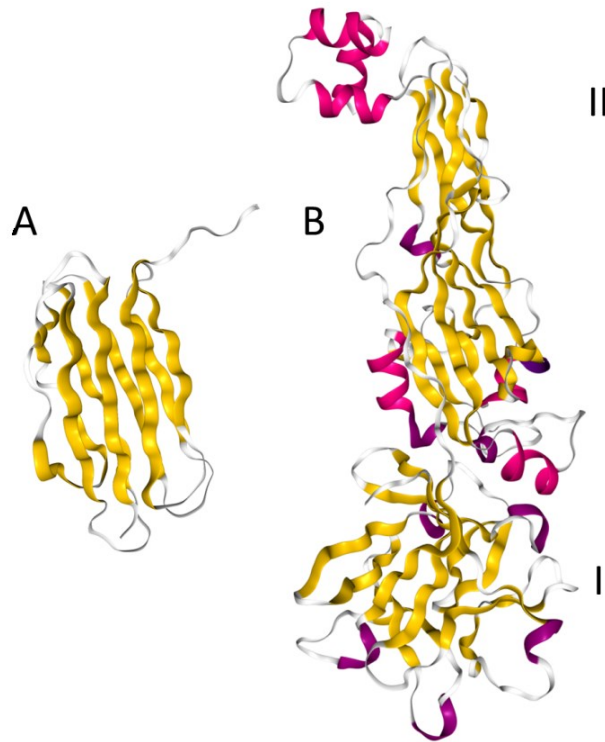


Figure 7 Structure de la Cry34Ab1 (4JOX) (A) et de la Cry35Ab1 (4JP0) (B)

1.2.4.4. Parasporines

Les parasporines sont des toxines Cry pour lesquelles aucune activité insecticide n'a pu être démontrée, mais qui tuent efficacement un certain nombre de cellules tumorales en culture (Ohba, Mizuki et Uemori 2009). Elles sont regroupées en six familles en plus d'être classées parmi les autres toxines Cry. La Parasporine 2, ou Cry46Aa1, a fait l'objet d'études particulièrement détaillées qui ont mené, entre autres, à l'élucidation de sa structure atomique avec une résolution de 2,38 Å (Akiba et al. 2009) (Figure 8). Celle-ci diffère de celle de toutes les autres toxines Cry dont on connaît la structure, à l'exception de la Cry51Aa, une toxine active contre certains coléoptères dont la structure atomique vient d'être élucidée (Xu

et al. 2015) et une protéine qu'on retrouve dans les cristaux parasporaux produits par *B. thuringiensis* mais qui n'est pas incluse dans la classification des toxines Cry parce qu'aucune toxicité n'a pu lui être attribuée jusqu'à présent (Akiba et al. 2006). Ces trois protéines présentent par contre une grande similitude avec les toxines formeuses de pore de la famille de l'aérolysine (Dal Peraro et van der Goot 2016). Bien que ces toxines possèdent trois domaines, ceux-ci sont presque exclusivement constitués de feuillets β , contrairement aux autres toxines Cry généralement qualifiées de toxines à trois domaines (Section 1.2.4.1). Notons que la structure atomique de la Parasporine 1, ou Cry31Aa1, vient d'être publiée (Akiba et Okumura 2016). Elle possède toutes les caractéristiques des toxines dites à trois domaines et ne présente aucune ressemblance avec la Parasporine 2.

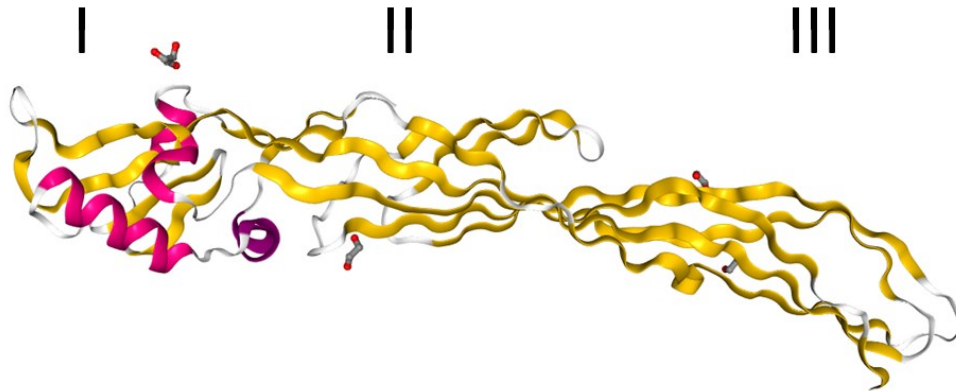


Figure 8 Structure de la Parasporine 2 (2ZTB)

1.2.4.5. Cyt1Aa1

Les toxines Cyt (cytolytiques) s'accumulent, comme les toxines Cry, sous forme de cristaux parasporaux pendant la sporulation de *B. thuringiensis*, mais il n'existe aucune homologie de

séquence entre ces deux familles de toxines. Habituellement actives contre certains insectes diptères *in vivo*, les toxines Cyt peuvent également entraîner la lyse des globules rouges de plusieurs espèces de mammifères dans des expériences *in vitro* (Butko 2003; Bravo, Gill et Soberón 2007). Leur mode d'action est encore sujet à débat. Elles agissent au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules cibles, mais elles pourraient soit y former des pores (Knowles et al. 1989; Promdonkoy et Ellar 2003) ou la déstabiliser à la manière d'un détergent (Butko 2003; Manceva et al. 2005). La structure tridimensionnelle de trois d'entre elles a été publiée jusqu'à présent : Cyt1Aa (Cohen et al. 2011), Cyt2Aa (Li, Koni et Ellar 1996) et Cyt2Ba (Cohen et al. 2008). Ces toxines, qui ne ressemblent en rien aux toxines Cry, sont formées d'un feuillet β pris en sandwich entre deux hélices α (Figure 9).



Figure 9 Structure de la Cyt1Aa1 (3RON)

1.2.4.6. Vip2

Contrairement aux toxines Cry et Cyt, les toxines Vip sont produites pendant la phase de croissance végétative (Chakroun et al. 2016). Vip1 et Vip2 agissent en tandem pour former une toxine binaire dans laquelle Vip1 est responsable de la reconnaissance cellulaire et permet à Vip2 de traverser la membrane par un mécanisme qui est encore mal compris. La formation de pores dans des bicouches lipidiques planes par la protéine Vip1 a été démontrée (Leuber et al. 2006), mais il n'est pas encore clairement établi que ceux-ci puissent servir de canal par où Vip2 pourrait diffuser au travers de la membrane (Chakroun et al. 2016). Vip2 est une enzyme qui catalyse le transfert d'un groupement ADP-ribose sur les molécules d'actine, ce qui interfère avec la biosynthèse et le renouvellement du cytosquelette. Sa structure en deux domaines, chacun composé de feuillets β et d'hélices α , a été élucidée à une résolution de 1,5 Å (Han et al. 1999)(Figure 10). Les toxines Vip3 sont actives contre une grande variété de lépidoptères (Estruch et al. 1996). Elles forment des pores (Lee et al. 2003), mais leur structure tridimensionnelle n'a pas encore été établie.

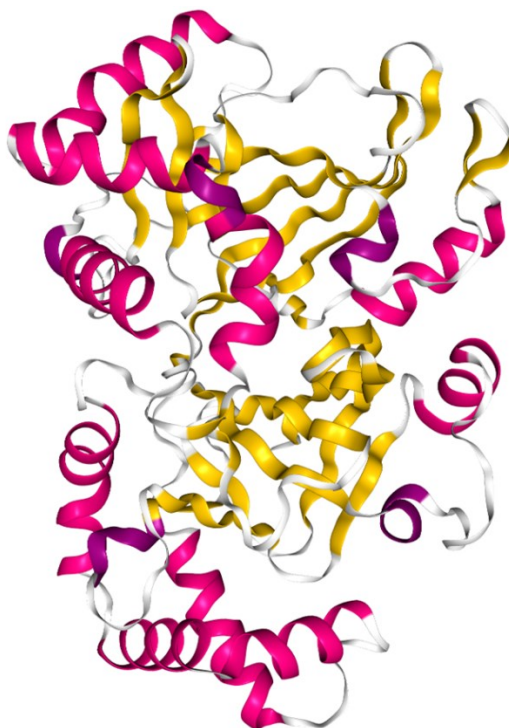


Figure 10 Structure de Vip2 (1QS1)

1.3. *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte et *Diabrotica barberi*

La chrysomèle des racines du maïs, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (*Western corn rootworm* (WCR)), ainsi que la chrysomèle des racines du maïs du nord, *Diabrotica barberi* (*Northern corn rootworm*), sont les principaux ravageurs du maïs aux États-Unis, au Mexique ainsi que dans plusieurs pays d'Europe. Au Canada, la présence de ces ravageurs est observée, mais à des niveaux plus faibles. Selon une estimation effectuée en 1986, les coûts engendrés aux États-Unis par les pertes dues à ces ravageurs et par les mesures prises pour les contrôler atteignent au moins 1 milliard de dollars par année (Metcalf 1986).

Le cycle vital de ces insectes coléoptères comporte quatre stades : œufs, larves, pupes et adultes. Les larves de ces insectes sont la principale cause des dégâts occasionnés aux plantes. Elles creusent des galeries dans les racines et s'en nourrissent. Ceci procure un abri pour les larves, et il est plus difficile de les contrôler avec des insecticides. Les adultes se nourrissent des feuilles et des tiges (Levine et Oloumi-Sadeghi 1991) et possèdent des ailes leur permettant de voyager sur de grandes distances et d'être emportés par le vent, colonisant ainsi de nouveaux territoires. Comme les femelles ont tendance à se reproduire rapidement suivant l'éclosion de leurs pupes (Hill 1975), elles pondent dans le sol du champ environnant (Spencer et al. 2009). Les œufs ont besoin d'une période de diapause froide afin de pouvoir éclore et les larves n'éclosent qu'après l'hiver. Puisque les deux espèces de chrysomèles ont une diète très spécifique, leurs populations peuvent être contrôlées en effectuant une rotation des cultures avec des champs de soya, une plante bien protégée contre les coléoptères du fait qu'elle produit des inhibiteurs de protéases à cystéine (Chu et al. 2015). Les larves de chrysomèle qui viennent d'éclore et qui ne trouvent pas de maïs pour se nourrir meurent alors peu de temps après leur naissance (Spencer et al. 2009). Jusqu'en 1995, le contrôle de ces ravageurs était principalement effectué par de telles rotations des cultures. Malheureusement, cette méthode de contrôle a soumis les populations de chrysomèle à une énorme pression de sélection, et des infestations ont été observées malgré la rotation agricole (Gray et al. 2009). Il n'est pas rare, de nos jours, de voir des insectes résistants à la rotation des cultures se nourrir et pondre leurs œufs dans les champs de soya et de maïs (Levine et al. 2002). La grande capacité d'adaptation de la chrysomèle a permis aux femelles d'être plus attirées vers les champs de soya même si le fait de manger les

feuilles de soya est moins nourrissant pour elles. Les populations résistantes ont montré une activité enzymatique plus grande que les populations natives, une production plus grande d'enzymes et une résistance accrue aux inhibiteurs provenant du soya (Curzi et al. 2012). De plus, comme les femelles pondent dans les champs de soya, lors de la rotation des cultures, les larves naissent l'année suivante dans un champ de maïs, ce qui favorise leur croissance. En Europe, ce problème ne semble pas être encore apparu en raison de la plus grande diversité des cultures utilisées lors de la rotation de celles-ci (Gray et al. 2009).

1.3.1. Toxines Cry pouvant contrôler *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte

Présentement, les toxines Cry3Bb1 et mCry3Aa1 ainsi que la toxine binaire Cry34Ab1/Cry35Ab1 sont utilisées comme principaux insecticides dans la lutte contre la chrysomèle, la plupart du temps dans des plantes transgéniques (Tabashnik et Gould 2012). Malheureusement, le nombre d'insectes résistants à ces toxines est en augmentation et il est nécessaire d'effectuer des études avec d'autres toxines afin de pouvoir continuer à contrôler ces insectes. La toxine Cry6Aa1, la toxine binaire composée des protéines DS10 et DS11, ainsi que la toxine DS12, sont à l'heure actuelle parmi les candidats les plus prometteurs.

1.3.1.1. Cry6Aa1

Il existe deux toxines Cry6, Cry6Aa et Cry6Ba (Crickmore et al. 2016). On connaît peu d'organismes qui leur sont sensibles. La Cry6Aa1 est néanmoins efficace contre la chrysomèle et certains nématodes (*Panagrellus redivivus*, *C. elegans* et *Distolabrellus veechi*) alors que

Cry6Ba1 est active contre le coléoptère *Hypera postica* (Wei et al. 2003; Sharma, Kumar et Bhatnagar 2011). Les études sur Cry6Aa1 ont montré que *C. elegans* est affecté différemment par la toxine. Lorsque les larves ne meurent pas en raison de la toxine, elles sont plus petites, leurs habitudes alimentaires sont modifiées, et elles ont plus de difficulté à se déplacer (Luo et al. 2013). Un fait intéressant à propos de cette toxine est qu'elle peut agir complémentirement avec la toxine Cry5Ba1. Les larves qui ont développé une résistance à cette dernière toxine restent sensibles à la Cry6Aa1 (Yu et al. 2014).

1.3.1.2. Toxines DS10, DS11, DS12

On connaît très peu de choses sur ces nouvelles protéines du bacille de Thuringe à part le fait qu'elles sont toxiques pour la chrysomèle. Parce qu'elles n'ont pas encore été intégrées dans la classification des toxines Cry, elles sont identifiées par un nom de code. DS10 et DS11 doivent agir ensemble comme une toxine binaire alors que DS12 peut tuer les larves lorsqu'elle est seule. Elle est très fortement homologue à DS11.

1.4. Hypothèses

Bien qu'on connaisse la structure tridimensionnelle de la Cry6Aa1 (Section 1.2.4.6), son mode d'action, ainsi que celui des protéines DS10, DS11 et DS12, n'ont pas encore été exploré de façon détaillée. Les hypothèses de départ pour ce travail sont que ces toxines forment des pores dans des bicouches lipidiques et que le mode d'action de la Cry6Aa1 est différent de celui des autres toxines Cry.

1.5. Objectifs

Comme la plupart des toxines Cry étudiées jusqu'à présent agissent en formant des pores dans la membrane intestinale de leur organisme cible, notre laboratoire se consacre depuis quelques années, en collaboration avec un groupe de chercheurs de Dow AgroSciences d'Indianapolis aux États-Unis, à l'analyse de la capacité de ces toxines à former des pores. Notons que des études menées dans notre laboratoire, parallèlement au travail présenté dans ce mémoire, ont montré que la Cry6Aa1 peut former des pores dans les bicouches lipidiques planes (Fortea et al. 2016). Des études semblables avec DS10, DS11 et DS12 viennent à peine de débiter. Par contre, il n'a pas été possible de préparer des vésicules membranaires présentant les caractéristiques requises pour l'étude de la formation des pores par ces toxines à partir de la membrane intestinale de la chrysomèle.

L'objectif principal de ce travail était donc de développer une nouvelle méthode simple, et complémentaire aux analyses en bicouches lipidiques, permettant d'étudier la formation de pores par les toxines Cry en utilisant des liposomes. Une fois cette technique mise au point, elle a été utilisée pour une étude détaillée des propriétés de Cry6Aa1 et de la toxine binaire DS10/DS11. Enfin, ces travaux ont jeté les bases pour la mise au point d'une méthode permettant l'analyse des propriétés des toxines dans des vésicules membranaires artificielles préparées en incorporant des protéines membranaires provenant de l'intestin d'insectes sensibles à ces toxines dans des protéoliposomes.

2. Matériel et méthodes

2.1. Produits chimiques

La L- α -phosphatidylcholine, extraite du jaune d'œuf, la trypsine, traitée au TPCK (N-p-tosyl-L-phenylalanine chlorométhyle cétone), le Sephadex G-50, les tampons Hepes (acide N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonique]), Tris (tris[hydroxyméthyl]aminométhane) et Caps (acide 3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonique), les détergents CHAPS (acide 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonique), dodécylmaltoside et désoxycholate, ainsi que l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique), le glucose, la L-alanine, le N-méthyl-D-glucamine, le gluconate de potassium et la valinomycine proviennent de chez Sigma (Oakville, Ontario) et le KCl et le citrate de potassium, de chez Fisher Scientific (Baie D'Urfé, Québec). Le L- α -phosphatidyl-DL-glycérol, purifié du jaune d'œufs, et le cholestérol ont été achetés chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama). Les sondes fluorescentes 5(6)-carboxyfluorescéine et diS-C₃(5) ont été achetées chez Molecular Probes (Eugene, Oregon).

2.2. Préparation des toxines

La préparation de la toxine Cry6Aa1 et de ses dérivés, ainsi que des toxines portant les noms de code DS10, DS11 et DS12 a été effectuée par nos collègues de chez Dow AgroScience à Indianapolis. Les toxines Cry1Aa et Cry1Ac, produites à partir de cristaux parasporaux de *B. thuringiensis*, ont été généreusement fournies par le Dr. Marianne Puztai-Carey du Département de biochimie de la Case Western Reserve University de Cleveland en Ohio.

La toxine native Cry6Aa1 a été exprimée dans *Pseudomonas fluorescens*, et les corps d'inclusion ont été purifiés avec une méthode décrite précédemment (Tan et al. 2016) et conservés à -80°C. Environ 100 mg de corps d'inclusion ont été décongelés à 4°C et centrifugés pendant 20 min à 31 000 x g à 4°C. Le culot a été solubilisé en le resuspendant dans 20 ml de 100 mM Caps/KOH, pH 10, et en l'incubant sur une table à bascule à température de la pièce (Figure 11, piste 2).

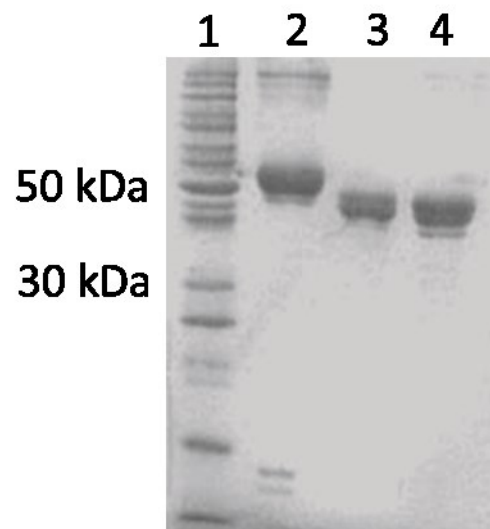


Figure 11 Électrophorèse de la Cry6Aa1. Les différentes pistes représentent des marqueurs de poids moléculaire (1), la Cry6Aa1 native (2), traitée avec le suc intestinal de la Chrysomèle (3) ou avec la trypsine (4). Copié avec la permission de Fortea et al. (2016)

Les protéines solubilisées ont ensuite été purifiées à température ambiante en utilisant une chromatographie par échange d'ions avec une colonne HiTrap Q HP de 5 ml et un purificateur de protéines AKTA (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, Pennsylvanie). Les extraits de protéine ont ensuite été dilués avec une solution composée de 20 mM Caps/KOH, pH 10, et filtrés sous vide avec une membrane ayant une faible affinité pour les protéines et

des pores de 0,45 μm . Les échantillons ont été injectés à 3 ml/min dans une colonne pré-équilibrée avec le tampon A (50 mM Caps/KOH, pH 10). La colonne a été rincée avec environ 25 ml de tampon A et la protéine a été éluée en utilisant un gradient linéaire variant de 0 à 100% de tampon B (50 mM Caps/KOH, pH 10, et 1 M NaCl) sur 40 fois le volume de la colonne. Les fractions contenant la protéine cible purifiée ont été identifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium. Les fractions contenant la protéine cible ont été rassemblées et concentrées en utilisant un dispositif de filtrage par centrifugation avec une limite de poids moléculaire de 30 kDa. Le dosage des protéines cibles a été effectué en comparant les valeurs densitométriques des bandes avec celles d'échantillons standard d'albumine de sérum bovin placés sur le même gel pour générer une courbe étalon avec le logiciel ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences).

Les toxines DS11 et DS12 ont été produites en suivant ce même protocole. La toxine DS10 ainsi que la toxine binaire DS10/DS11, dont les deux composantes sont coexprimées et copurifiées, ont été préparées avec un protocole semblable, sauf que les corps d'inclusion utilisés comme matériel de départ avaient été produits dans *Bt*.

2.3. Extraction du suc intestinal des larves de la chrysomèle

Environ 150 larves du troisième stade larvaire de la chrysomèle, expédiées avec des racines de maïs, ont été obtenues auprès de Crop Characteristics (Farmington, Minnesota). Les extrémités antérieure et postérieure des larves ont été coupées avec un scalpel, et l'intestin a été retiré, en utilisant une pince, et stocké sur glace dans une solution composée de 150

mM NaCl et 8,5% (p/v) de sucrose. Le tissu a été homogénéisé sur la glace dans un appareil en verre, et le matériel insoluble a été éliminé par centrifugation dans une microcentrifugeuse Eppendorf à 7500 x g pendant 15 min à 4°C. La quantité de protéines dans les surnageants a été estimée en utilisant un dosage de Bradford (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire). Ces extraits de suc intestinal ont ensuite été stockés en petites aliquotes à -80°C pour une utilisation future.

2.4. Traitement de la Cry6Aa1 avec du suc intestinal de la chrysomèle

La Cry6Aa1 native (10 mg) a été mélangée avec 1 mg de protéine de suc intestinal de la chrysomèle dans 10 ml d'une solution composée de 200 mM de citrate de sodium et 4 mM d'EDTA, pH 6,0. Après 3 heures d'incubation à température ambiante, des aliquotes ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour s'assurer que la digestion était complète (Figure 11, piste 3). La réaction a été arrêtée par l'addition d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma) et le mélange a été dialysé pendant une nuit contre une solution composée de 20 mM Caps/KOH, pH 10, puis fractionné par chromatographie échangeuse d'ions. Les fractions contenant la protéine cible ont été rassemblées et concentrées en utilisant un dispositif d'ultrafiltration avec un filtre Millipore ayant une limite de poids moléculaire de 30 kDa.

2.5. Traitement de la Cry6Aa1 avec la trypsine

Environ 100 mg de corps d'inclusion de Cry6Aa1 ont été décongelés à 4°C et centrifugés à 23 000 x g pendant 25 min à 4°C. Le culot a été solubilisé dans 10 ml de tampon de digestion (100 mM Caps/KOH, pH 10), et 6,6 mg de trypsine, provenant du pancréas bovin et traitée avec le TPCK, ont été ajoutés à l'échantillon pour atteindre un rapport Cry6Aa1:trypsine de 15:1 (p/p). Le mélange a été incubé pendant une nuit à la température ambiante (environ 16 h) sur une table à bascule. Après la période de digestion, le produit a été centrifugé à 31 000 x g pendant 25 min à 4°C. Le surnageant a été conservé pour une purification sur colonne échangeuse d'ions. Le tampon des fractions contenant la toxine purifiée a finalement été échangé par dialyse contre 4 litres de 20 mM Caps/KOH, pH 10.

2.6. Matériel de la bordure en brosse intestinale

Des fractions cellulaires enrichies en membrane à bordure en brosse intestinale de la chrysomèle ont été préparées à partir d'intestins disséqués et congelés de larves du troisième stade avec la méthode décrite par Wolfersberger et al. (1987). Parce que les larves de cet insecte sont relativement petites, une partie des essais de préparation de protéoliposomes ont été réalisés avec du matériel préparé avec la même technique, mais à partir d'intestins du lépidoptère *Mamestra configurata* (Légionnaire bertha) provenant des réserves du laboratoire. Le niveau d'enrichissement de ces préparations a été évalué en comparant l'activité enzymatique de la leucine aminopeptidase, dosée avec le protocole de George et Kenny (1973), dans le produit final et dans l'homogénat de départ.

2.7. Sonde fluorescente

2.7.1. Préparation

La solution stock de sonde fluorescente contient 50 mM de carboxyfluorescéine, 10 mM de KCl, 10 mM d'Hepes et environ 135 mM de KOH (Schwarz et Arbuzova 1995). La sonde est acide et ne peut être mise en solution que dans un milieu suffisamment alcalin. Le KOH est donc utilisé pour ajuster le pH à 7,5. Il faut laisser du temps au système de s'équilibrer entre l'ajout de KOH et la mesure du pH car lorsque le pH monte, la sonde se solubilise et fait baisser le pH. Il est parfois nécessaire d'ajouter un peu plus de KOH afin de s'assurer que le pH demeure stable à 7,5.

2.7.2. Propriétés

La 5-(6)-carboxyfluorescéine est une sonde hydrophobe fluorescente composée d'une molécule de fluorescéine à laquelle un groupement carboxyle a été ajouté. Elle possède une longueur d'onde d'excitation de 490 nm et d'émission de 520 nm (Aschi et al. 2008). Lorsque la sonde est à forte concentration, comme dans les liposomes, elle n'émet que relativement peu de fluorescence. Ce phénomène est appelé extinction de fluorescence (*fluorescence quenching*). Lorsqu'elle est libérée dans le milieu environnant, sa fluorescence augmente considérablement puisque sa concentration diminue, et ce, en fonction de la concentration de toxine utilisée.

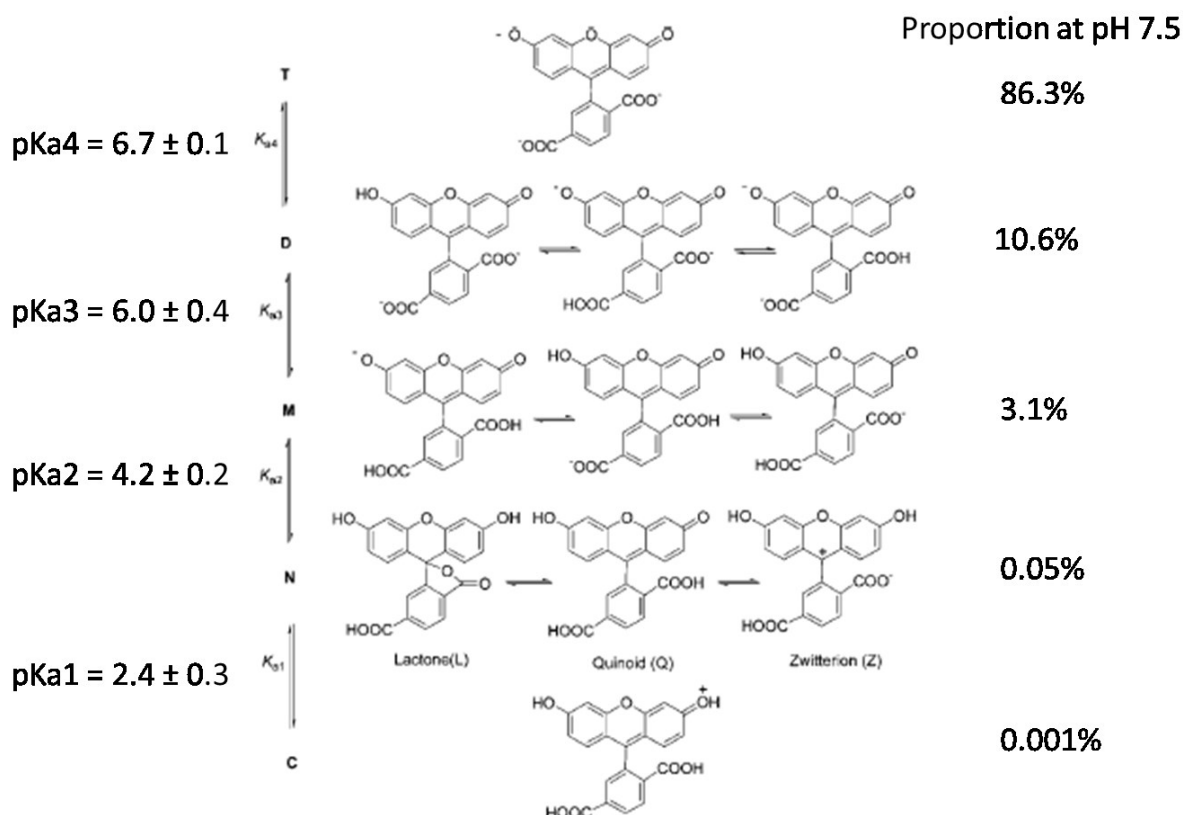


Figure 12 Les différentes formes moléculaires que la 6-carboxyfluorescéine peut prendre. Adapté avec la permission d'Aschi et al. (2008). Les proportions occupées par les différentes formes ont été calculées avec l'équation de Henderson-Hasselbach (Po et Senozan 2001) et les estimations présentées, à gauche de la figure, par ces auteurs pour les valeurs de pK_a .

En plus d'être hydrophobe, cette sonde peut être cationique, neutre ou porter une, deux ou trois charges négatives (Figure 12). La proportion occupée dans la solution par chaque forme dépend du pH. En utilisant les différents pK_a mesurés par le groupe d'Aschi (2008), il a été possible de calculer qu'à pH neutre, la presque totalité de la sonde est anionique. Les expériences ont été développées en considérant qu'une molécule de sonde doit traverser les membranes en étant accompagnée de 2,8 charges positives (moyenne pondérée pour les

différentes formes ioniques) ou en échange du même nombre de charges négatives. La présence des charges sur cette molécule créent une légère polarisation.

2.8. Liposomes géants

Les liposomes géants sont des liposomes ayant un diamètre supérieur à 1 μm . Il est donc possible de les observer en utilisant un microscope optique. Pour leur préparation, les lipides solubilisés dans le chloroforme (10 mg) sont déposés dans un tube en verre et le chloroforme est évaporé sous un jet fin d'azote en tournant continuellement le tube. Cela crée un film mince de lipides sur la paroi du tube. Le tube est ensuite laissé sous vide pour 30 min dans un dessiccateur afin de s'assurer que le chloroforme est complètement évaporé. La solution de carboxyfluorescéine (500 μl) est alors ajoutée aux lipides, et le tube est brassé délicatement à la main, puis laissé à température ambiante sur un agitateur à bascule pendant toute la nuit (Akashi et al. 1996, 1998). Il est important de couvrir le tube afin de le protéger de la lumière pour ne pas blanchir la sonde. Le lendemain, un second brassage manuel délicat est effectué et la préparation est remise à agiter pour 30 min. Parfois, un brassage supplémentaire est requis afin de briser des agglomérats de liposomes géants. La sonde demeurant dans le milieu extravésiculaire est retirée de la préparation par chromatographie sur colonne de Sephadex G-50 (1,0 cm x 13,0 cm) éluée avec un tampon contenant 107 mM de KCl, 10 mM Hepes/Tris, pH 7,5 (Schwarz et Arbuzova 1995).

2.9. Préparation de grands liposomes unilamellaires par extrusion

Les lipides sont asséchés et réhydratés, de la même façon que pour la préparation des liposomes géants, avec 500 µl du tampon approprié, selon le type d'expériences pour lequel les liposomes sont préparés. La resuspension des lipides s'effectue cependant rapidement au vortex plutôt que très délicatement pendant toute la nuit. La préparation est alors transférée dans un mini-système d'extrusion (Avanti Polar Lipids) avec un filtre Whatman (Mississauga, Ontario) de 200 nm. Au total, 21 passages sont effectués, dans un mouvement de va-et-vient, afin d'uniformiser la taille des liposomes à un diamètre voisin de celui des pores (Hope et al. 1985; MacDonald et al. 1991). Dans le cas où les liposomes sont chargés avec la carboxyfluorescéine, la sonde extravésiculaire est enlevée de la préparation par chromatographie, comme pour les liposomes géants.

2.10. Microphotographie

Les photos présentées dans ce travail ont été prises avec une caméra GS3-U3-14S5M-C provenant de la compagnie Point Grey (Richmond, Colombie-Britannique) montée sur un microscope inversé Olympus (Center Valley, Pennsylvanie) équipé d'un objectif de 100X et fonctionnant avec de l'huile à immersion. Un micromètre pour microscope permet de mesurer la taille des liposomes géants.

2.11. Mesures de fluorescence

Les expériences ont été réalisées à température ambiante avec un spectrofluorimètre Spex Fluorolog CM-3 (Jobin Yvon Horiba, Edison, New Jersey) et des cuvettes de polystyrène contenant un agitateur magnétique et 3 ml d'un tampon approprié. Les mesures ont été faites aux longueurs d'ondes d'excitation de 490 nm et d'émission de 520 nm et à une fréquence de 1 Hz. Les liposomes (3 μ l) chargés en carboxyfluorescéine sont injectés dans la cuvette immédiatement avant le début de l'enregistrement. Lorsque le niveau de fluorescence est stabilisé (10-20 s), la toxine ou l'ionophore dont on veut tester l'effet est ajouté directement dans le milieu. À la fin de l'expérience, environ 25 min après l'injection, 50 μ l d'une solution de 100 mM de Triton-X100 sont ajoutés afin de briser complètement les liposomes pour libérer toute la sonde et mesurer le niveau de fluorescence maximal.

2.12. Normalisation des données

La valeur moyenne des mesures de fluorescence, avant l'injection de toxine, est soustraite à la courbe entière afin d'obtenir le niveau zéro de fluorescence. Ensuite, suivant l'ajout de Triton X-100, la valeur moyenne est mesurée lorsque la fluorescence est redevenue stable. Celle-ci correspond au niveau 100% sur les graphiques. L'échelle de temps est synchronisée avec le moment de l'injection. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois. Les valeurs présentées dans les figures sont des moyennes \pm l'erreur-type. Pour alléger les graphiques, celle-ci n'est présentée qu'à tous les 60 points expérimentaux.

2.13. Autres mesures de perméabilité membranaire

Des liposomes, préparés la plupart du temps avec la technique d'extrusion, ont été évalués avec des expériences de gonflement osmotique semblables à celles qui ont été abondamment utilisées, dans notre laboratoire, pour analyser l'effet des toxines Cry sur la perméabilité membranaire de vésicules de membrane à bordure en brosse intestinale provenant d'insectes cibles (Carroll et Ellar 1993; Coux et al. 2001; Kirouac et al. 2006). La perméabilité membranaire de liposomes a également été évaluée avec la diS-C₃(5), une sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire déjà utilisée pour étudier l'effet de toxines bactériennes sur des vésicules de membrane à bordure en brosse d'insectes (Kirouac et al. 2003) et de porcelets (Gonçalves et al. 2007).

3. Résultats

3.1. Comparaison de différentes méthodes de préparation de liposomes

Comme il a été mentionné dans le Chapitre 1 (Section 1.2.3.6), la capacité de nombreuses toxines Cry à former des pores transmembranaires, ainsi que les propriétés biophysiques de ces pores, ont été étudiées de façon détaillée en utilisant des vésicules de membrane à bordure en brosse intestinale provenant d'insectes cibles. La plupart de ces études ont cependant été menées avec des vésicules provenant du sphinx du tabac (*Manduca sexta*), un insecte lépidoptère à partir duquel il est facile de préparer des vésicules membranaires de très grande qualité, bien étanches et se comportant comme d'excellents osmomètres en réponse aux changements dans les conditions osmotiques du milieu environnant. Les essais de préparation de vésicules à partir des intestins de la chrysomèle se sont par contre avérés infructueux, le matériel final ne répondant à peu près pas aux chocs osmotiques.

3.1.1. Grands liposomes unilamellaires

Dans le but de contourner ce problème, de grands liposomes unilamellaires (*large unilamellar vesicles*) ont d'abord été préparés avec une technique d'extrusion bien établie (Hope et al. 1985; MacDonald et al. 1991) et décrite plus en détail dans le chapitre 2 (Section 2.9). Les liposomes ainsi préparés étaient bien étanches puisqu'il était possible de générer un potentiel membranaire, mis en évidence avec la sonde fluorescente diS-C₃(5), en utilisant un protocole expérimental similaire à celui qui avait été mis au point pour les travaux réalisés

avec les vésicules de membrane à bordure en brosse (Kirouac et al. 2003). Ils répondaient aussi très bien aux chocs osmotiques qui leur étaient imposés dans des expériences semblables à celles qui ont été menées auparavant avec ce même type de vésicules membranaires et qui utilisaient des mesures de l'intensité de la lumière diffusée pour détecter les changements de volume des vésicules (Carroll et Ellar 1993; Coux et al. 2001; Tran et al. 2001; Kirouac et al. 2006). Les toxines Cry testées (Cry1Aa, Cry1Ac et Cry6Aa1) n'avaient cependant que très peu d'effet sur la perméabilité membranaire de ces liposomes même lorsqu'elles étaient utilisées à des concentrations largement suffisantes pour former des pores dans des membranes lipidiques planes (20-50 µg/ml).

Puisque la plupart des toxines Cry étudiées jusqu'à présent doivent interagir avec un récepteur membranaire pour fonctionner de façon optimale (Chapitre 1, Section 1.2.3.5), de nombreux essais ont été réalisés dans le but de préparer des protéoliposomes incorporant des protéines et des lipides provenant de la membrane intestinale d'insectes. Les phospholipides ont été resuspendus avec du matériel enrichi de la membrane à bordure en brosse, préalablement solubilisé ou non avec un détergent (CHAPS, dodécylmaltoside, désoxycholate). Lorsque présents, les détergents ont ensuite été retirés du mélange par dilution, par dialyse ou par chromatographie d'exclusion pour permettre la formation des protéoliposomes. Ces travaux ont fait intervenir la technique d'extrusion ou une série de gels dans l'azote liquide et de dégels dans le but d'augmenter et d'uniformiser la taille des vésicules. Ces travaux se sont également avérés infructueux, soit que le matériel produit ne se comportait pas comme une suspension de vésicules étanches, ou, dans les cas où les

expériences témoins donnaient des résultats intéressants, que les toxines n'avaient pas d'effet apparent sur la perméabilité membranaire d'éventuels protéoliposomes. Soulignons néanmoins que la reconstitution fonctionnelle des protéines de la membrane à bordure en brosse a toujours représenté un défi de taille quelle que soit la provenance du matériel membranaire utilisé (Koepsell 1986; Koepsell et Seibicke 1990; Vachon et al. 1991).

Par ailleurs, il était plutôt surprenant que la Cry6Aa1 ait eu si peu d'effet sur la perméabilité membranaire des liposomes étant donné qu'il avait déjà été démontré dans notre laboratoire qu'elle forme des pores dans les membranes lipidiques planes à des concentrations remarquablement plus faibles que n'importe laquelle des toxines Cry étudiées auparavant (Forte et al. 2016). Cette constatation a suggéré la possibilité que l'insertion de la toxine puisse se produire beaucoup plus efficacement dans les membranes planes que dans celles des liposomes à cause de la forte courbure de celles-ci. L'influence de ce facteur sur l'activité d'autres toxines formeuses de pores est bien documenté (Tabaei et al. 2012; Fujii, Matsuura et Yomo 2015).

3.1.2. Liposomes géants

Dans le but de réduire la courbure de la membrane, des essais de perméabilité membranaire ont donc été réalisés avec des liposomes géants. Ce genre de liposomes est habituellement utilisé pour permettre l'étude, avec la technique de *patch-clamp*, de canaux transmembranaires difficilement accessibles dans les cellules intactes. Dans les travaux présentés ici, les liposomes ont été préparés de façon à incorporer la carboxyfluorescéine,

une sonde fluorescente utilisée comme marqueur de perméabilité membranaire, dans le milieu intravésiculaire.

Les liposomes géants préparés avec de la phosphatidylcholine seule ne migrent pas normalement lors de la chromatographie utilisée pour les séparer de la sonde demeurant dans le milieu extravésiculaire. Au lieu de traverser rapidement la colonne et de se retrouver dans les fractions correspondant au volume mort de celle-ci, presque tout le matériel insoluble est resté à la surface du gel de Sephadex. Comme le montre la Figure 13, ces liposomes, photographiés avant l'étape de chromatographie, se retrouvent surtout sous forme de gros agrégats. Ceux-ci comprennent des liposomes d'un diamètre allant jusqu'à environ 5 μm , et donc bien visibles en microscopie optique, contrairement aux liposomes préparés avec des techniques plus classiques, mais leur agrégation explique qu'ils soient retenus par la colonne et difficilement récupérables pour des expériences de perméabilité membranaire. Dans le but d'éliminer la possibilité que l'agrégation soit due à la présence d'une forte concentration de carboxyfluorescéine (50 mM) dans le tampon utilisé pour la formation des liposomes, des préparations ont été obtenues avec la même technique, mais après avoir remplacé la carboxyfluorescéine par une solution isotonique de KCl, celle qui sert de tampon d'élution lors de la chromatographie. Les liposomes ainsi préparés ne se distinguaient pas de façon notable par rapport à ceux de la Figure 13 préparés avec la sonde fluorescente (résultat non illustré).

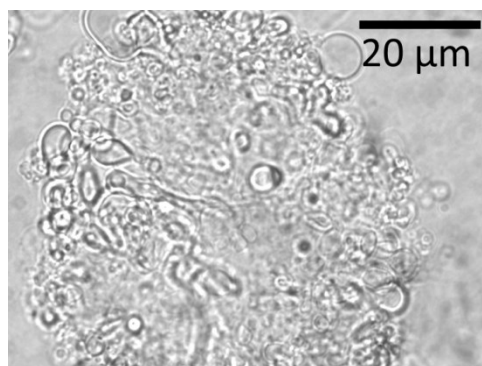


Figure 13 Morphologie de liposomes géants préparés avec 100% de phosphatidylcholine. Un échantillon représentatif a été photographié, sans qu'il ne subisse de chromatographie, avec une caméra numérique GS3-U3-14S5M-C (Point Grey) montée sur un microscope Olympus, et au travers d'un objectif 100X, sous huile à immersion.

Sur la base des recommandations d'Akashi et al. (1996), qui ont examiné l'effet de la composition des phospholipides sur les propriétés biophysiques des liposomes géants, de nouveaux liposomes ont été préparés avec 90% de phosphatidylcholine et 10% de phosphatidylglycérol. Ce dernier lipide, contrairement à la phosphatidylcholine, possède une charge nette négative. Selon ces auteurs, l'utilisation d'une proportion relativement élevée de lipides chargés (10-20%) pour la formation des liposomes géants permet d'optimiser la proportion des liposomes unilamellaires dans les préparations. En plus, comme le montre la Figure 14, l'ajout de phosphatidylglycérol a permis de réduire considérablement l'agrégation des liposomes. On peut distinguer dans de telles préparations la présence de liposomes géants avec un diamètre de quelques dizaines de μm , mais aussi des liposomes de plus petite taille. Une telle hétérogénéité dans la taille des liposomes est habituellement observée dans les préparations de liposomes géants (Akashi et al. 1996, 1998). Par ailleurs ces liposomes ont migré normalement au travers de la colonne et se sont retrouvés dans les fractions

correspondant à son volume mort, mais surtout, ils se sont avérés d'excellents outils pour l'étude de la formation des pores par la toxine Cry6Aa1 (Section 3.2) et la toxine binaire DS10/11 (Section 3.3).

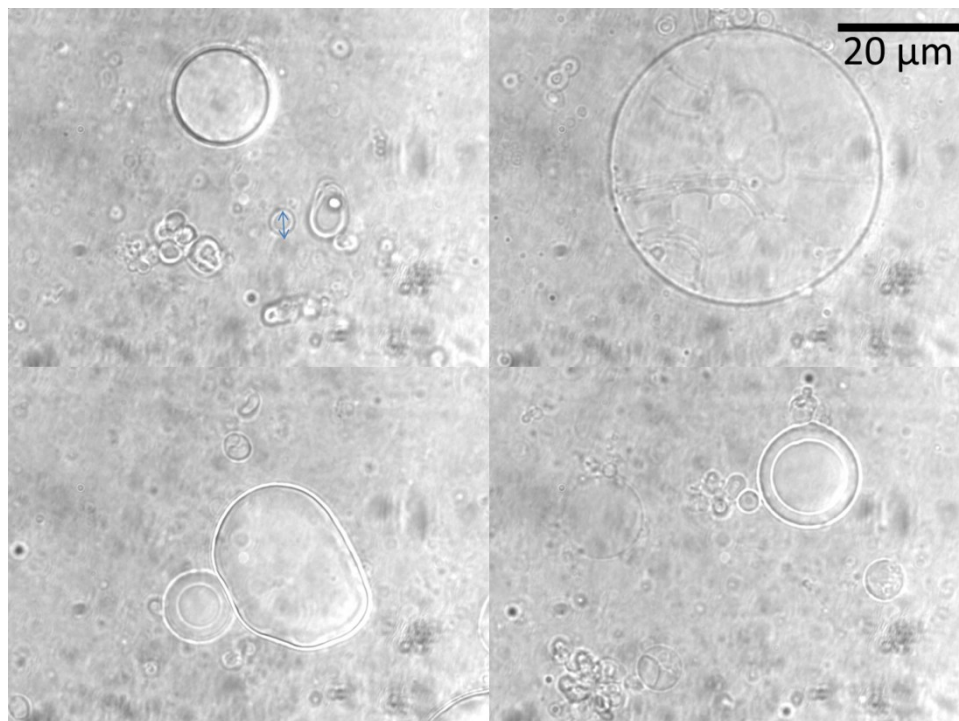


Figure 14 Morphologie de liposomes géants préparés avec 90% de phosphatidylcholine et 10% de phosphatidylglycérol. Les quatre photographies représentatives ont été prises dans les mêmes conditions que celle de la Figure 13.

3.2. Cry6Aa1

Des études récentes menées dans notre laboratoire (Forte et al. 2016) ont montré que la Cry6Aa1 perméabilise efficacement des bicouches lipidiques planes sans avoir besoin d'être activée par une protéase, et ce, à des concentrations jusqu'à 2000 fois plus faibles que celles qui sont habituellement nécessaires dans ce genre d'expériences réalisées avec d'autres toxines Cry. Elle possède également une excellente capacité à perméabiliser la membrane

des liposomes géants (Figure 15) puisqu'on observe un efflux de la sonde. Cet efflux augmente avec la concentration de toxine. Ce facteur peut être un bon indicateur que la toxine forme des pores dans les liposomes.

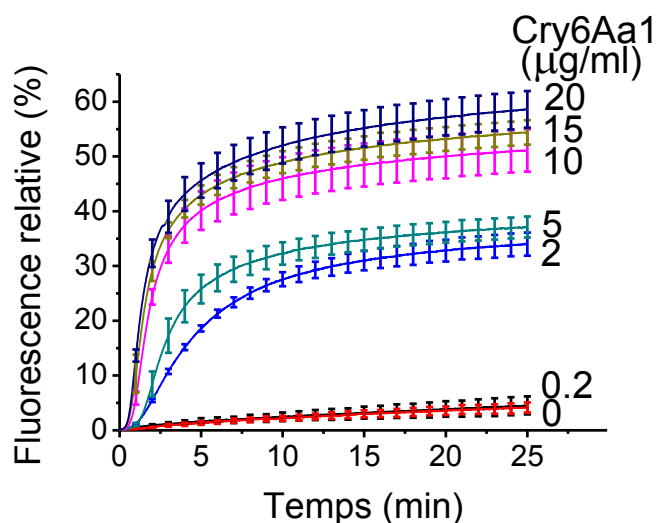


Figure 15 Effet de la concentration de la forme native de la toxine Cry6Aa1 sur la perméabilité de liposomes géants. Les liposomes, préparés avec 90% de phosphatidylcholine et 10% de phosphatidylglycérol, et chargés en carboxyfluorescéine, tel que décrit dans le chapitre Matériel et méthodes, sont suspendus dans un tampon composé de 107 mM de KCl et 10 mM d'Hepes/Tris, pH 7,5. La toxine est ajoutée, au temps 0, aux concentrations indiquées, et la fluorescence est normalisée par rapport au niveau mesuré, à la fin de l'expérience, en présence de 1,6 mM de Triton X-100 et correspondant à 100%. Les valeurs représentent la moyenne et l'erreur-type d'au moins trois expériences. Les barres d'erreur ne sont montrées qu'à tous les 60 points expérimentaux pour alléger le graphique.

Dans le but d'examiner plus à fond les propriétés des pores formés par la toxine et le mécanisme par lequel ceux-ci entraînent la libération de la sonde, des expériences semblables à celle qui est illustrée dans la Figure 15 ont été réalisées en faisant varier la taille et la charge des solutés présents dans le milieu extravésiculaire (Figure 16). La toxine est particulièrement active dans les solutions de KCl et de gluconate de potassium, un peu moins active dans les solutions d'hydrochlorure de N-méthyl-D-glucamine et de citrate de

potassium, et finalement très peu active dans les solutions de glucose et de L-alanine. Puisque la composition du milieu intravésiculaire demeure la même dans toutes ces expériences, l'utilisation de ces différentes solutions permet de faire varier les gradients ioniques établis au travers de la membrane comme le montre le Tableau II ainsi que la mobilité des ions impliqués.

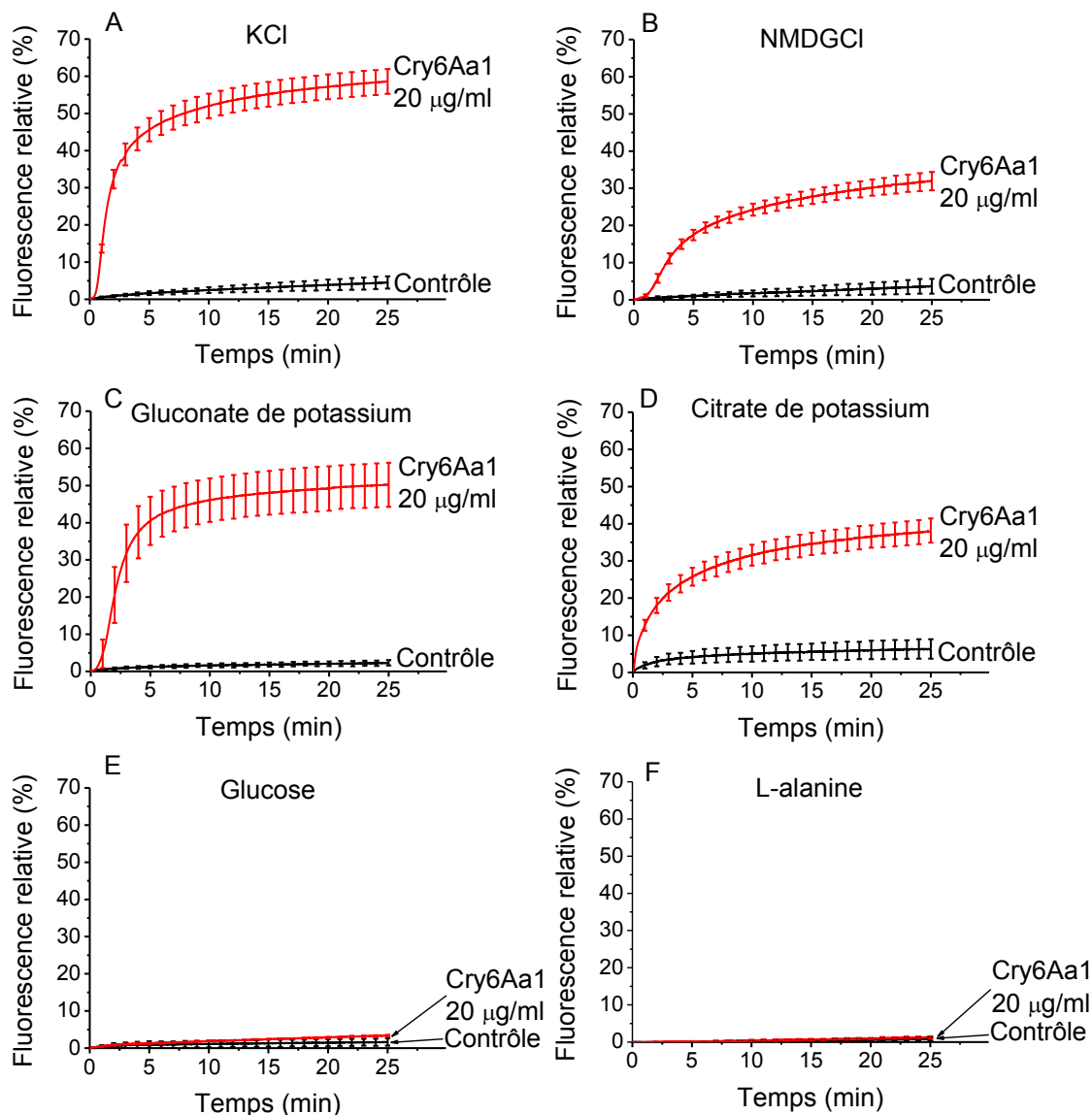


Figure 16 Effet de la composition du milieu extravésiculaire sur la capacité de la forme native de la Cry6Aa1 à perméabiliser des liposomes géants. Les expériences sont réalisées, tel que décrit dans la légende de la Figure 15, en présence ou en absence de 20 µg/ml de toxine, dans une cuvette contenant 10 mM d'Hepes/Tris, pH 7,5, et 107 mM de KCl (A), d'hydrochlorure de N-méthyl-D-glucamine (NMDGCl) (B) ou de gluconate de potassium (C), 53,5 mM de citrate de potassium (D), ou 214 mM de glucose (E) ou de L-alanine (F).

Tableau II Gradients ioniques établis de part et d'autre de la membrane dans les expériences utilisant la carboxyfluorescéine

	Tampon	Gradient entrant	Gradient sortant ⁽¹⁾
A	KCl 107 mM	97 mM Cl ⁻	38 mM K ⁺
B	NMDGCl ⁽²⁾ 107 mM	97 mM Cl ⁻ 107 mM NMDG ⁺	145 mM K ⁺
C	K glu ⁽³⁾ 107 mM	107 mM glu ⁻	10 mM Cl ⁻ 38 mM K ⁺
D	K ₃ Cit ⁽⁴⁾ 53.5 mM	53.5 mM citrate ³⁻ 15.5 mM K ⁺	10 mM Cl ⁻
E	Glucose 214 mM	214 mM glucose	10 mM Cl ⁻ 145 mM K ⁺
F	L-alanine 214 mM	214 mM L-alanine	10 mM Cl ⁻ 145 mM K ⁺

⁽¹⁾ Présence d'un gradient sortant de 5(6)-carboxyfluorescéine de 50 mM dans toutes les expériences

⁽²⁾ NMDGCl = chlorure de N-méthyl-D-Glucamine

⁽³⁾ K glu = gluconate de potassium

⁽⁴⁾ K₃ Cit = Citrate de potassium

Parce que la sonde est chargée négativement, elle ne peut sortir des liposomes qu'accompagnée d'un efflux de cations ou d'un influx d'anions. Par contre, les augmentations de fluorescence montrées dans la Figure 16 ne semblent pas dépendre de la présence ni de l'intensité des gradients cationiques sortants. Elles semblent dépendre beaucoup plus de la présence et de l'intensité des gradients anioniques entrants, bien que l'effet des ceux-ci semble atténué par la présence simultanée d'un gradient cationique dirigé dans le même sens comme dans le cas de l'hydrochlorure de N-méthyl-D-glucamine et celui du citrate de potassium. Si l'on compare les données du Tableau II pour les expériences en KCl et NMDGCl, on remarque que le gradient sortant de potassium est augmenté de 38 mM à 145 mM. Le gradient entrant de chlore est identique dans les deux cas, mais en

hydrochlorure de N-méthyl-D-glucamine, le N-méthyl-D-glucamine vient réduire l'effet du gradient de chlore en traversant la membrane en même temps. Si les pores étaient cationiques, on aurait observé une augmentation de la vitesse d'efflux de la sonde, pas une diminution. Pour les Figures 16A, 16C et 16D, les gradients et les efflux observés sont similaires. Les valeurs légèrement plus faibles pour le citrate de potassium pourraient l'être à cause de l'absence du gradient de potassium sortant qui est remplacé par un petit gradient entrant. Aussi, en absence de gradient ionique entrant, la toxine a un effet négligeable sur la perméabilité des liposomes en présence de glucose ou de L-alanine. Ces résultats seraient donc attribuables à la formation de pores essentiellement anioniques peu perméables aux cations.

En accord avec cette interprétation, un fort efflux de sonde est observé, en absence de toxine, lorsque la perméabilité membranaire est augmentée artificiellement par l'ajout de valinomycine, un ionophore à potassium bien connu, dans les expériences réalisées dans la solution de glucose (Figure 17A). On pourrait cependant soulever la possibilité que, dans ces expériences, la valinomycine déstabilise les liposomes plutôt que d'en augmenter spécifiquement la perméabilité aux ions potassiques. La fuite de sonde ne serait donc, selon cette hypothèse, que le résultat de la lyse progressive des liposomes. Cette possibilité apparaît cependant peu plausible à la lumière du fait que la valinomycine n'a eu aucun effet sur la capacité des liposomes à retenir la sonde dans la solution de citrate de potassium, une condition expérimentale dans laquelle il n'y a pas de gradient sortant de potassium, mais plutôt un faible gradient entrant (15,5 mM) (Figure 17B). Elle peut agir aussi efficacement lorsque la membrane est chargée ou non et en présence ou en absence de force ionique. Si la charge

des lipides ou la faiblesse de la force ionique de la solution empêchait (ou ne faisait que réduire) l'interaction de la valinomycine avec les liposomes les résultats montrés dans les Figures 17A et 17B seraient identiques.

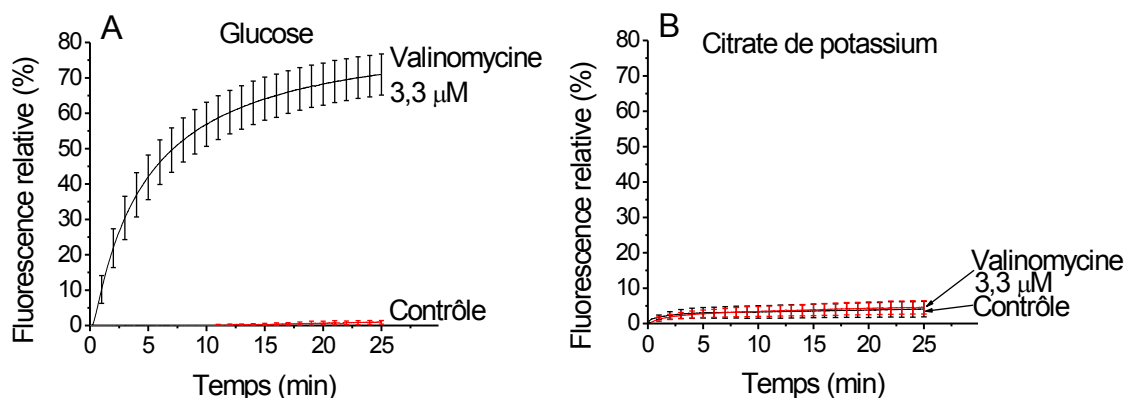


Figure 17 Effet de la valinomycine sur la perméabilité des liposomes géants. Les expériences sont réalisées tel que décrit dans la légende de la Figure 15, en présence ou en absence de 3,3 mM de valinomycine, à la place de la toxine, dans une cuvette contenant 10 mM d'Hepes/Tris, pH 7,5, et 214 mM de glucose (A) ou 53,5 mM de citrate de potassium (B).

L'incapacité de la toxine à perméabiliser les liposomes en présence de glucose pourrait néanmoins aussi s'expliquer par le fait que la force ionique est beaucoup plus faible dans cette solution que dans toutes les autres qui ont été étudiées dans l'expérience illustrée dans la Figure 17.

La possibilité a été soulevée plus haut que l'efficacité avec laquelle la Cry6Aa1 forme des pores dépende de la courbure de la membrane cible. Cette hypothèse a donc été testée en comparant la capacité de cette toxine à perméabiliser deux types de liposomes : des grands liposomes unilamellaires, préparés avec la technique d'extrusion au travers de membranes ayant des pores de 200 nm, et des liposomes géants semblables à ceux qui ont servi pour la

plupart des expériences présentées dans ce mémoire. Ces liposomes ne diffèrent donc que par la technique utilisée pour leur préparation et leur taille. Autrement, ils ont la même composition lipidique (90% phosphatidylcholine et 10 % phosphatidylglycérol) et leur perméabilisation par la Cry6Aa1 a été étudiée avec la même technique expérimentale. Comme le montre clairement la Figure 18, la toxine perméabilise beaucoup mieux les liposomes géants.

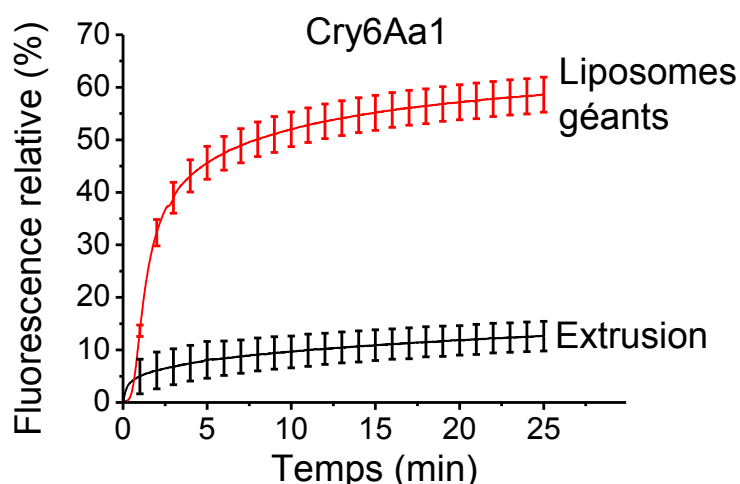


Figure 18 Comparaison de la capacité de la forme native de la Cry6Aa1 à perméabiliser des grands liposomes unilamellaires, préparés avec la technique d'extrusion, et des liposomes géants. Les expériences sont réalisées tel que décrit dans la légende de la Figure 15 en présence de 20 $\mu\text{g/ml}$ de toxine.

Afin de s'assurer que ce résultat reflète bien une différence dans la capacité de la toxine à perméabiliser les deux types de liposomes plutôt qu'à une plus grande difficulté des liposomes préparés par extrusion à laisser s'échapper la sonde lorsque perméabilisés, l'effet de la valinomycine a été testé sur ceux-ci dans le tampon glucose. En fait, la valinomycine a permis de libérer la totalité de la sonde fluorescente (Figure 219), plutôt que seulement

environ 70% dans le cas des liposomes géants (Figure 17A), un résultat attendu en raison de la technique de fabrication qui est réputée pour former des liposomes unilamellaires. En comparant les expériences effectuées avec la valinomycine, il est possible d'estimer que les liposomes géants peuvent laisser passer 70% des ions contenus à l'intérieur avant d'atteindre un équilibre.

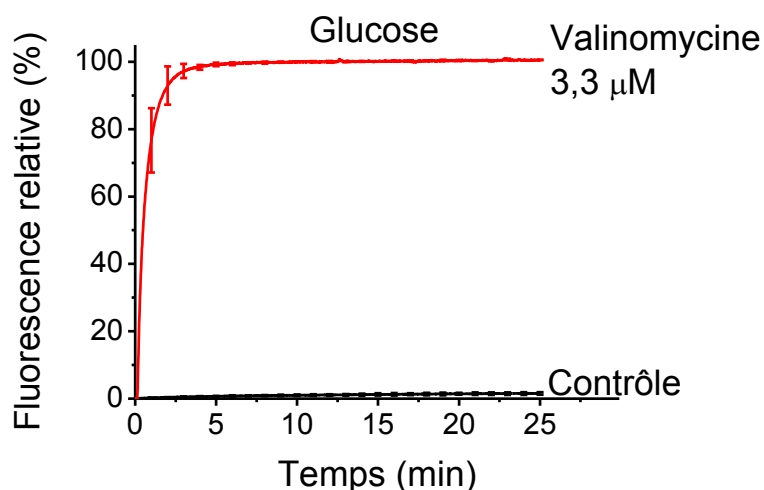


Figure 19 Effet de la valinomycine sur la perméabilité des liposomes préparés par extrusion. Les expériences sont réalisées tel que décrit dans la légende de la Figure 15, en présence ou en absence de 3,3 mM de valinomycine, à la place de la toxine, dans une cuvette contenant 10 mM d'Hepes/Tris, pH 7,5, et 214 mM de glucose.

3.2.1. Effet du cholestérol

Comme il a été mentionné dans le Chapitre 1 (Section 1.2.4.2), la Cry6Aa1 possède une structure similaire à celle de l'hémolysine E (ClyA) produite par *E. coli*. Des travaux effectués avec cette toxine et des liposomes multilamellaires chargés avec la carboxyfluorescéine ont montré que l'ajout de cholestérol aux lipides utilisés pour la préparation des liposomes

permet d'augmenter l'effet perméabilisant de la ClyA (Oscarsson et al. 1999). Dans le but de tester si le cholestérol peut influencer l'efficacité de la Cry6Aa1, la composition molaire des liposomes a été modifiée pour obtenir 67,5% de phosphatidylcholine, 7,5% de phosphatidylglycérol et 25% de cholestérol, une composition identique à celle des expériences réalisées avec la ClyA (Oscarsson et al. 1999). Cette proportion de cholestérol est semblable à celle qu'on retrouve dans la membrane à bordure en brosse intestinale des coléoptères (Jordão, Terra et Ferreira 1995). La Figure 20 montre qu'à l'inverse de ce qui est observé pour la ClyA, l'ajout de cholestérol rend les liposomes beaucoup moins sensibles à la Cry6Aa1.

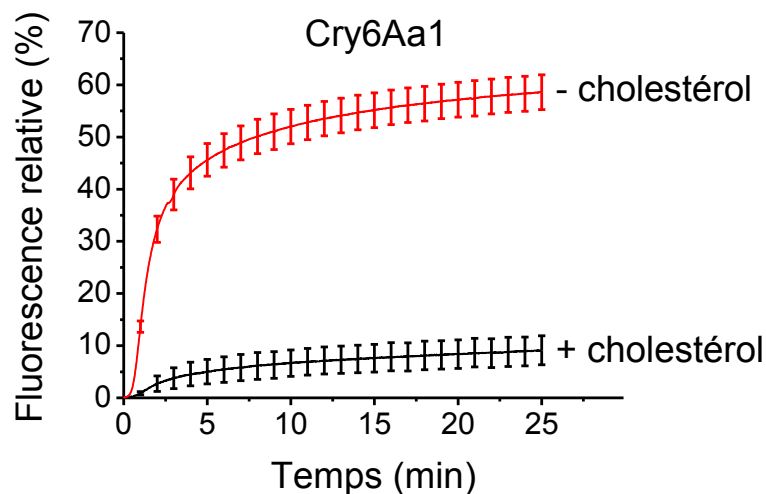


Figure 20 Effet du cholestérol sur la capacité de la forme native de la Cry6Aa1 à perméabiliser des liposomes géants. Les expériences sont réalisées tel que décrit dans la légende de la Figure 15 en présence de 20 µg/ml de toxine avec des liposomes géants préparés avec 90% de phosphatidylcholine et 10% de phosphatidylglycérol (- cholestérol), comme pour la plupart des autres expériences décrites dans ce mémoire, ou avec 67,5% de phosphatidylcholine, 7,5% de phosphatidylglycérol et 25% de cholestérol (+ cholestérol).

3.2.2. Effet de la protéolyse

Toutes les toxines Cry étudiées de façon détaillée jusqu'à présent sont produites sous forme de protoxines qui doivent subir une protéolyse pour acquérir leur virulence (Schnepf et al. 1998; Vachon et al. 2012). Normalement, cette transformation se produit dans l'intestin de l'insecte intoxiqué, mais elle doit être effectuée artificiellement pour les essais in vitro. L'incubation de la Cry6Aa1 avec des extraits du suc intestinal de la chrysomèle a fait passer son poids moléculaire de 55 kDa à environ 45 kDa. Des études de microséquençage sont présentement en cours de réalisation par nos collègues à Indianapolis afin de déterminer précisément les sites de protéolyse qui ont mené à cette transformation. La Figure 21 montre que deux préparations de Cry6Aa1 traitée avec le suc intestinal (WCR1 et WCR2) sont aussi efficaces que la toxine native à former des pores dans les liposomes géants pour une dose de 20 µg/ml. Il n'a pas encore été possible d'effectuer la même expérience sur une gamme étendue de concentrations en raison de limitations dans la quantité présentement disponible de ces toxines.

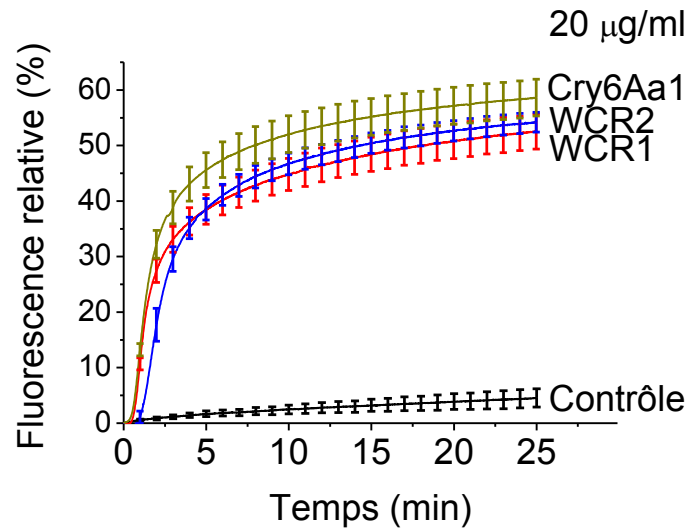


Figure 21 Effet du suc intestinal de la chrysomèle sur la capacité de la Cry6Aa1 à perméabiliser des liposomes géants. Les expériences sont réalisées tel que décrit dans la légende de la Figure 15 en présence de 20 µg/ml de la toxine native (Cry6Aa1), ou de l'une ou l'autre de deux préparations de Cry6Aa1 préalablement traitée avec le suc intestinal de la chrysomèle (WCR1 et WCR2).

La trypsine est souvent utilisée pour l'activation in vitro des toxines Cry. Le traitement de la toxine native avec cette enzyme produit un fragment majeur de 45 kDa composé des acides aminés 12 à 391 de la Cry6Aa1 et un peptide composé des acides aminés 442 à 475 provenant de son extrémité C-terminale. La toxine tryptsinisée s'est cependant avérée beaucoup moins active que la Cry6Aa1 native dans les liposomes géants (Figure 22). Lorsque testés individuellement, le fragment long est presque aussi actif que la toxine traitée avec la trypsine alors que le fragment court n'a pas montré de formation de pores. On note cependant que la cinétique initiale de formation de pores est plus rapide. Ce résultat inattendu pourrait être étudié plus en détails en répétant cette expérience en présence d'un agent réducteur afin de forcer la séparation des deux fragments qui, sous l'action de la trypsine seule, restent liés par un pont disulfure.

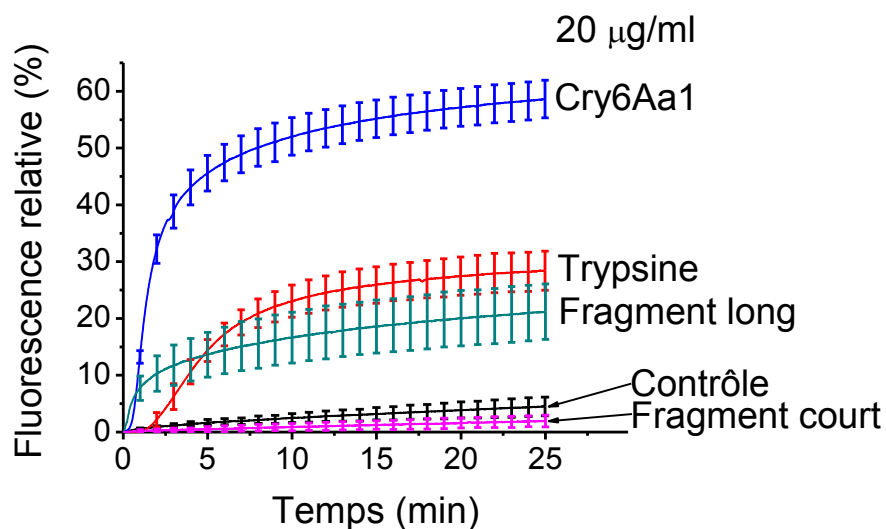


Figure 22 Comparaison la capacité à perméabiliser des liposomes géants de la Cry6Aa1 traitée avec la trypsine et des fragments produits par ce traitement. Les expériences sont réalisées tel que décrit dans la légende de la Figure 15 en présence de 20 µg/ml de la toxine native (Cry6Aa1), ou préalablement traitée avec la trypsine (Trypsine), ou des produits de ce traitement, le fragment long, purifié par chromatographie, et le fragment court, synthétisé chimiquement.

3.3. Toxine binaire DS10/DS11 et DS12

La toxine binaire DS10/DS11, avec ses deux composantes produites ensemble dans le bacille de Thuringe, a d'abord été testée dans les liposomes géants en suivant un protocole semblable à celui qui a été utilisé auparavant pour la Cry6Aa1 (Section 3.2.). Ces expériences constituent les premières études fonctionnelles à avoir été effectuées pour caractériser le mode d'action de cette toxine. Elle possède une grande capacité à perméabiliser la membrane des liposomes géants chargés avec la carboxyfluorescéine (Figure 23).

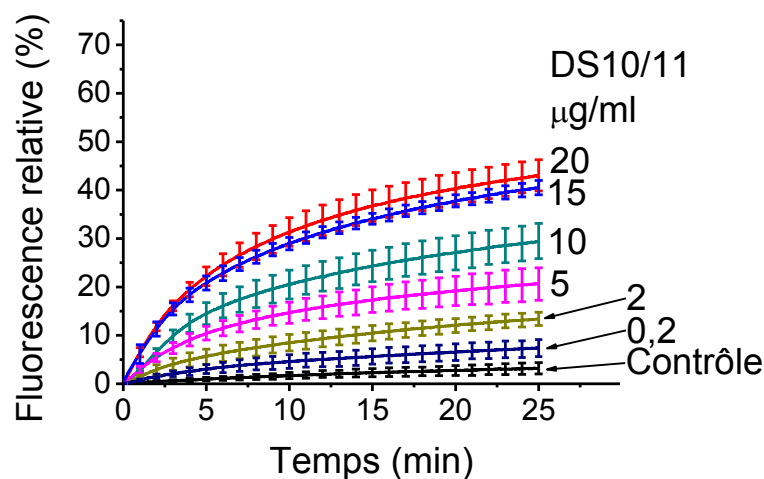


Figure 23 Effet de la concentration de la toxine binaire DS10/DS11 sur la perméabilité de liposomes géants. Les expériences sont réalisées, tel que décrit dans la légende de la Figure 15, en présence des concentrations indiquées de toxine et dans un tampon composé de 107 mM de KCl et 10 mM d'Hepes/Tris, pH 7,5.

La toxine binaire est active dans toutes les solutions dans lesquelles elle a été testée, même qu'elle entraîne un efflux plus rapide de la sonde dans la solution de glucose que dans celles de KCl, d'hydrochlorure de N-méthyl-D-glucamine, de gluconate de potassium et de citrate de potassium (Figure 24). Les Figures 24A et 24B montrent qu'en solution d'hydrochlorure de N-méthyl-D-glucamine (gradient sortant de potassium de 145 mM et gradient entrant de N-méthyl-D-glucamine de 108 mM), l'efflux de sonde est similaire à celui observé en KCl (gradient sortant de potassium de 38 mM). Le N-méthyl-D-glucamine peut traverser les pores accompagné par le chlore sans réduire l'efflux de sonde. Les gradients anioniques entrants ont aussi une petite influence sur les vitesses d'efflux de sonde comme l'illustre, par exemple, le fait que la fluorescence augmente avec une cinétique semblable dans les solutions d'hydrochlorure de N-méthyl-D-glucamine et de citrate de potassium (gradient

sortant de chlore de 10 mM et gradients entrants de potassium de 15.5 mM et citrate de 53.5 mM) malgré l'inversion du gradient de potassium. Ces résultats contrastent avec ceux des mêmes expériences réalisées avec la Cry6Aa1 (Figure 16). Dans le cas de la toxine binaire, l'efflux de carboxyfluorescéine corrèle mieux avec la présence et l'intensité des gradients sortants de potassium que dans celui de la Cry6Aa1. Ces résultats indiquent que la toxine binaire forme des pores légèrement cationiques, comme la plupart des toxines Cry étudiées auparavant (Kirouac et al. 2002). Ils montrent aussi que si la force ionique du milieu peut possiblement influencer la formation des pores par la Cry6Aa1, ce facteur a peu d'influence sur l'activité de la toxine binaire.

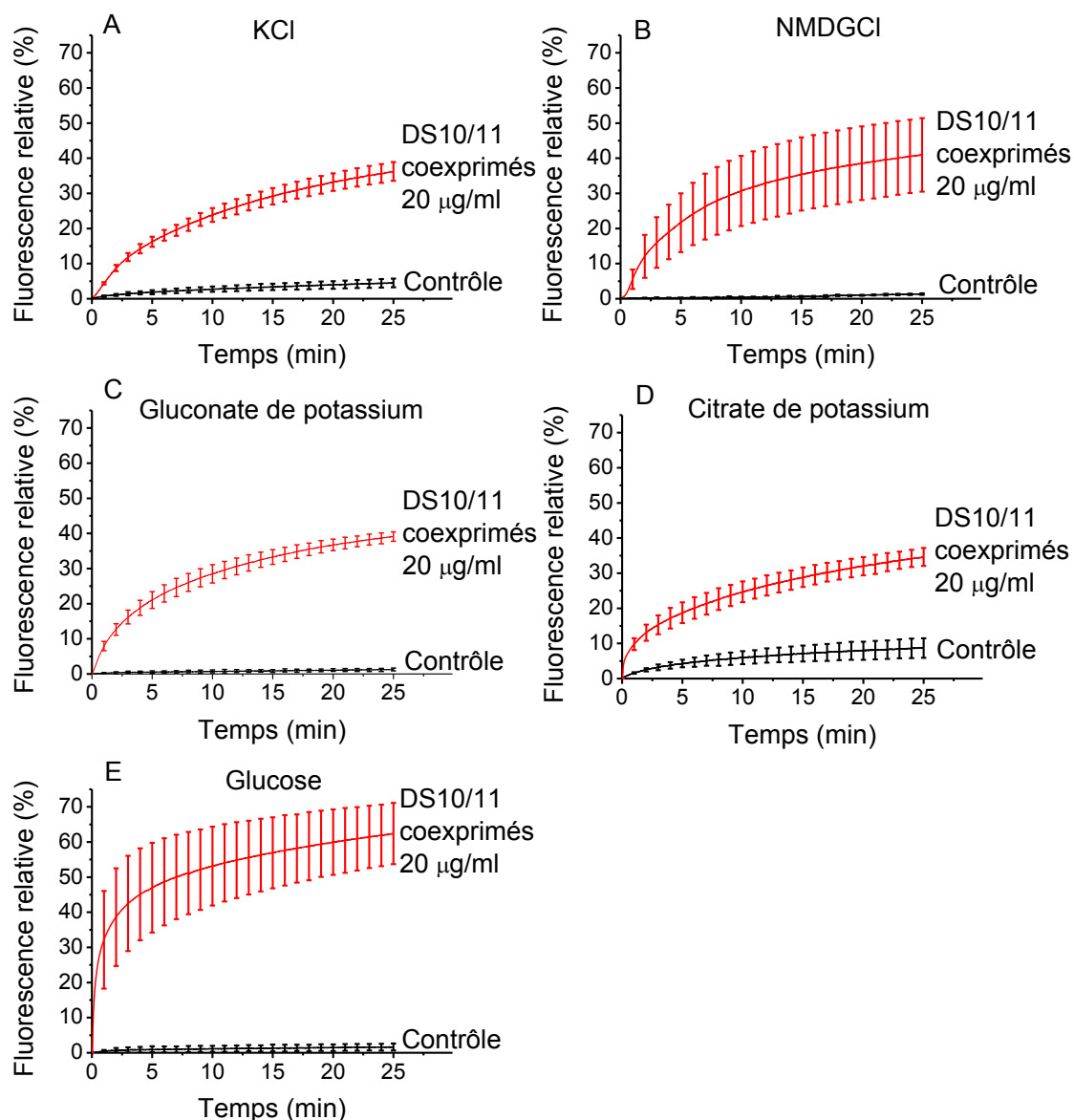


Figure 24 Effet de la composition du milieu sur la capacité de la toxine binaire DS10/DS11 à perméabiliser des liposomes géants. Les expériences sont réalisées, tel que décrit dans la légende de la Figure 15, en présence ou en absence de 20 $\mu\text{g/ml}$ de toxine, dans une cuvette contenant 10 mM d'Hepes/Tris, pH 7,5, et 107 mM de KCl (A), d'hydrochlorure de N-méthyl-D-glucamine (NMDGCI) (B) ou de gluconate de potassium (C), 53,5 mM de citrate de potassium (D), ou 214 mM de glucose (E).

Tout comme la Cry6Aa1 (Figure 18), la toxine binaire DS10/DS11 entraîne un efflux de carboxyfluorescéine beaucoup plus prononcé à partir des liposomes géants que des liposomes plus petits préparés avec la technique d'extrusion (Figure 25). Également, comme la Cry6Aa1 (Figure 16), la toxine binaire s'est avérée beaucoup moins efficace dans les liposomes géants enrichis en cholestérol que dans ceux qui n'en contenaient pas (Figure 26).

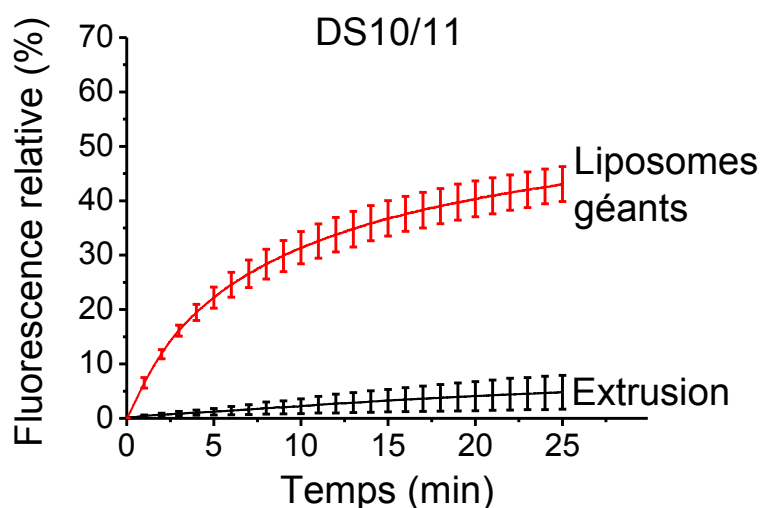


Figure 25 Comparaison de la capacité de la toxine binaire DS10/DS11 à perméabiliser des grands liposomes unilamellaires, préparés avec la technique d'extrusion, et des liposomes géants. Les expériences sont réalisées tel que décrit dans la légende de la Figure 15 en présence de 20 $\mu\text{g/ml}$ de toxine.

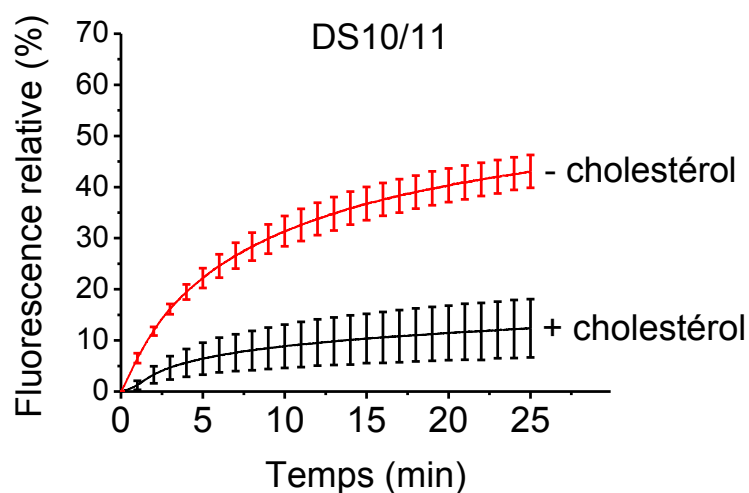


Figure 26 Effet du cholestérol sur la capacité de la toxine binaire DS10/DS11 à perméabiliser des liposomes géants. Les expériences sont réalisées tel que décrit dans la légende de la Figure 15, en présence de 20 $\mu\text{g/ml}$ de toxine avec des liposomes géants préparés avec 90% de phosphatidylcholine et 10% de phosphatidylglycérol (- cholestérol), comme pour la plupart des autres expériences décrites dans ce mémoire, ou avec 67,5% de phosphatidylcholine, 7,5% de phosphatidylglycérol et 25% de cholestérol (+ cholestérol).

Dans le but d'explorer le mode de fonctionnement de la toxine binaire, ses composantes DS10 et DS11 ont d'abord été testées individuellement dans les liposomes géants. Alors que la DS10 perméabilise les liposomes, mais beaucoup plus modestement que la toxine complète, la DS11 n'a presque pas d'effet (Figure 27). D'autre part, la DS12 n'a démontré aucune activité.

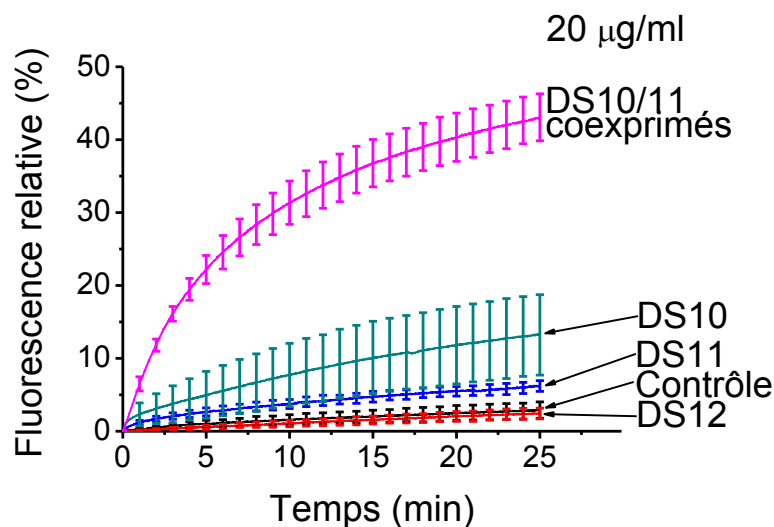


Figure 27 Comparaison de la capacité des protéines DS10, DS11 et DS12 à former des pores dans des liposomes géants. Les expériences sont réalisées, tel que décrit dans la légende de la Figure 15, en présence ou en absence de 20 µg/ml de toxine.

Les protéines DS10 et DS11, préparées individuellement, ont ensuite été mélangées dans un rapport de 6:1 (p/p) dans le but de reconstituer l'activité de la toxine binaire. Ce rapport a été choisi sur la base des estimations, réalisés par nos collègues de Dow AgroScience, démontrant que ces deux protéines sont produites par le bacille de Thuringe dans un rapport variant de 4:1 à 8:1. Des expériences semblables ont été réalisées en mélangeant la DS10 et la DS12 dans la même proportion. Dans les deux cas (Figure 28), le mélange a perméabilisé les liposomes seulement à peu près autant que la DS10 seule (Figure 27). Il ne peut pas être exclu cependant qu'il faille que ces toxines interagissent pendant un certain temps de façon à s'associer correctement pour exercer leur effet combiné. L'expérience décrite dans la Figure 27 a donc été répétée, mais en laissant les deux mélanges incuber à température ambiante pendant environ 20 h avant les mesures de fluorescence. La comparaison des

Figures 28 et 29 montre que la préincubation des protéines pendant la période de temps choisie n'a pas modifié de façon notable les résultats de l'expérience.

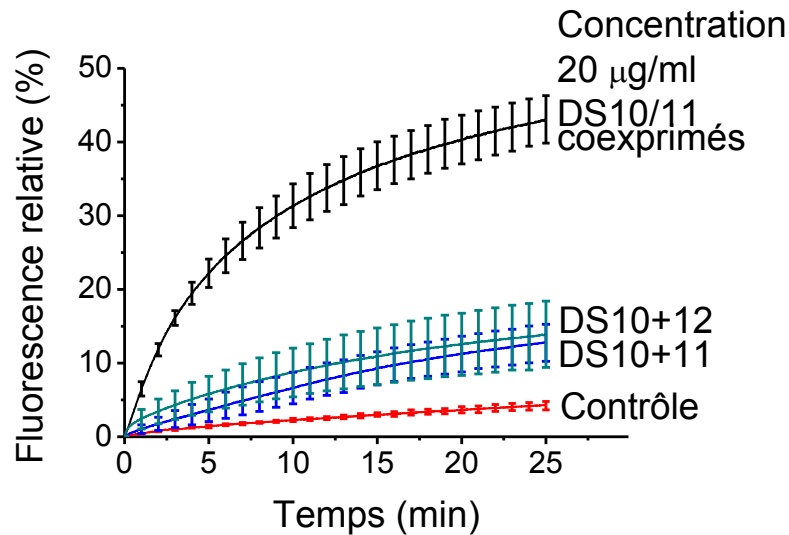


Figure 28 Effet du mélange de la DS10 avec la DS11 ou la DS12 sur la perméabilité des liposomes géants. Les expériences sont réalisées, tel que décrit dans la légende de la Figure 15, en présence de 20 $\mu\text{g/ml}$ de la toxine binaire DS10/11, d'un mélange de DS10 et de DS11, ou de DS10 et de DS12 dans une proportion de 6:1 (p/p). Les toxines ont été mélangées juste avant d'être injectées dans la cuvette du spectromètre pour l'expérience.

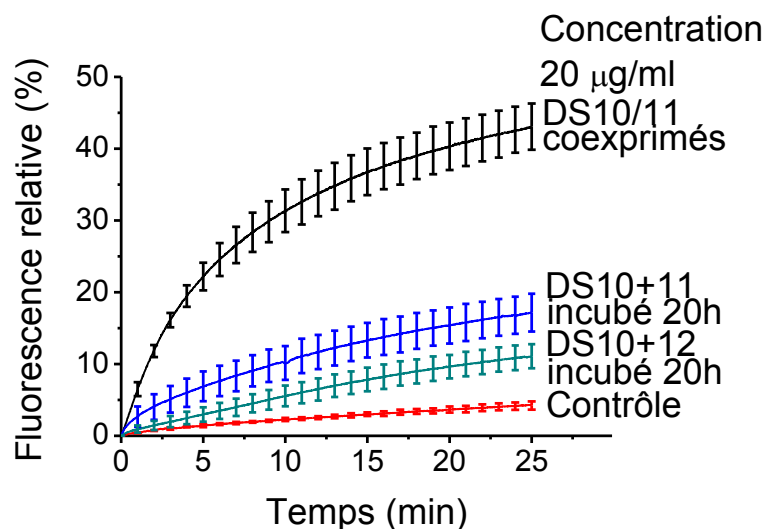


Figure 29 Effet d'une incubation prolongée du mélange de la DS10 avec la DS11 ou la DS12 sur leur capacité à perméabiliser les liposomes géants. Les expériences sont réalisées en suivant le même protocole que dans l'expérience illustrée dans la Figure 28 excepté que les mélanges de DS10 et DS11 ou de DS10 et DS12 ont incubé pendant 20h avant le début des mesures de fluorescence.

La possibilité que les conditions réductrices, qu'on retrouve dans l'intestin de tous les animaux, influence la capacité de la toxine binaire à former des pores, ou la capacité de ses composantes à s'associer correctement, a été examinée dans une expérience semblable à celle qui est décrite dans la Figure 29, mais en ajoutant 5 mM de dithiothréitol dans la cuvette lors des mesures de fluorescence. La présence de cet agent réducteur a cependant eu très peu d'effet sur les résultats hormis une légère stimulation de l'activité de la toxine binaire qui ne devient cependant apparente qu'après une quinzaine de minutes d'incubation avec les liposomes (Figure 30). En comparant les Figure 29 et 30, on remarque que le dithiothréitol a réduit l'activité du mélange. L'agent réducteur semble donc influencer l'activité de la DS10. Celle-ci semble protégée dans la toxine binaire, par la présence de DS11, mais non dans le mélange.

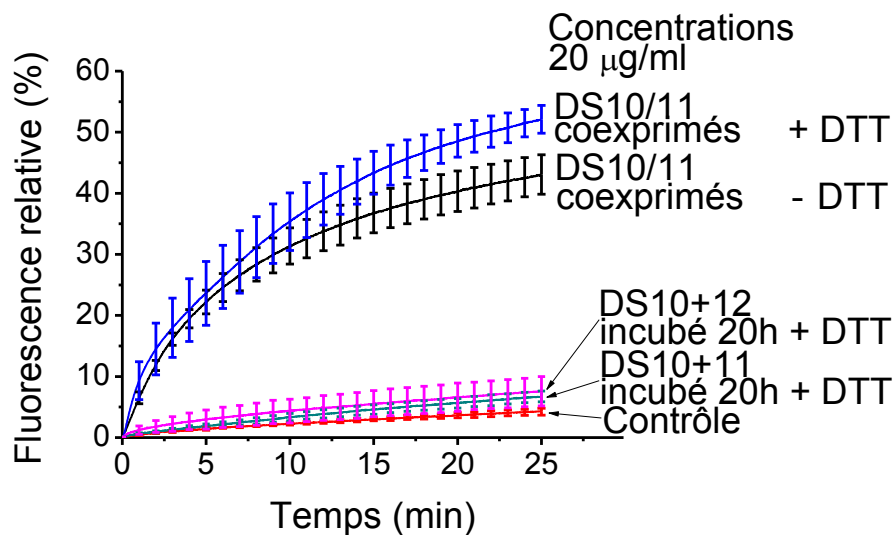


Figure 30 Effet des conditions réductrices sur l'activité de la toxine binaire DS10/DS11 et des mélanges de DS10 et DS11 ou de DS10 et DS12. Les expériences sont réalisées, tel que décrit dans la légende de la Figure 15, en présence ou en absence de 5mM de dithiothréitol et 20 $\mu\text{g/ml}$ de la toxine binaire DS10/DS11 ou des mélanges de DS10 et DS11 ou de DS10 et DS12 dans un rapport de 6:1 (p/p). Les mélanges ont incubé pendant 20h avant d'être injectés dans une cuvette contenant le dithiothréitol dans un tampon composé de 10 mM Hepes/Tris, pH 7,5 et de 107 mM KCl.

4. Discussion

Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent clairement que la Cry6Aa1 et la toxine binaire DS10/DS11 perméabilisent très efficacement la membrane des liposomes géants. L'activité des toxines est mise en évidence par l'augmentation de la fluorescence occasionnée par la libération de la carboxyfluorescéine emprisonnée dans les liposomes. Pour arriver à ces résultats, il a été nécessaire de développer une nouvelle technique de préparation de liposomes. Initialement, différentes expériences ont été effectuées en utilisant des liposomes préparés par la technique d'extrusion. Cependant il était impossible de montrer l'activité de la toxine Cry6Aa1 sur ces liposomes alors qu'en bicouche lipidique plane, la même toxine est en mesure de former des pores. Il a donc été nécessaire de préparer des liposomes géants qui possèdent une courbure plus faible. Lors de la préparation de liposomes géants, si du L- α -phosphatidylcholine est utilisé seul, les liposomes ont tendance à former des agglomérats. L'ajout de L- α -phosphatidyl-DL-glycérol a permis de réduire la quantité d'agrégats et de rendre les liposomes géants plus unilamellaires. La présence de phospholipides chargés modifie également l'environnement immédiat autour des liposomes. Ceci peut influencer l'interaction avec la sonde. Ce phénomène pourrait même être accentué lorsque la force ionique est faible comme pour les expériences effectuées avec la solution de glucose. Ces deux facteurs ont grandement contribué à la réussite de cette méthode. Cette étude est la première à montrer que les toxines Cry peuvent être affectées par la courbure de la membrane lipidique. Il a été démontré par Fujii

et al. (2015) que l'hémolysine α produite par *Staphylococcus aureus* est également affectée par la courbure.

Pour interpréter correctement les différents résultats obtenus en utilisant nos liposomes géants, il est nécessaire de s'interroger d'abord sur le mécanisme par lequel la toxine fait sortir la sonde des liposomes.

4.1. Mécanisme d'efflux de la carboxyfluorescéine

La 5-(6)carboxyfluorescéine est une sonde fluorescente composée d'une molécule de fluorescéine à laquelle un groupement carboxyle a été ajouté. Il s'agit en fait d'un mélange d'isomères ayant leur groupement carboxyle sur le carbone 5 ou sur le carbone 6. La présence du groupement carboxyle empêche la molécule de diffuser facilement au travers de la bicouche lipidique, ce qui permet de la concentrer à l'intérieur de vésicules membranaires et de l'utiliser comme sonde de perméabilité (Parish 1999).

La sonde forme des dimères non fluorescents lorsque sa concentration est élevée. Lorsque celle-ci diminue, les dimères se défont et la fluorescence augmente. En principe, les toxines pourraient permettre la sortie de la sonde de différentes façons. Elles pourraient d'abord déstabiliser la membrane des liposomes en s'y insérant à la manière d'un détergent. Un tel mécanisme a déjà été suggéré pour expliquer le mode d'action des toxines Cyt (Butko 2003; Manceva et al. 2005). Selon cette hypothèse, l'activité de la toxine ne devrait pas être influencée de façon appréciable par la composition de la solution dans laquelle l'expérience est réalisée. Or la capacité de la Cry6Aa1 (Figure 16) et de la toxine binaire DS10/DS11

(Figure 24) à perméabiliser les liposomes dépend fortement du milieu dans lequel elle est testée. Ce mécanisme n'apparaît donc pas comme une explication plausible des résultats de la présente étude.

On pourrait par ailleurs supposer que les toxines entraînent la fuite de la sonde par un mécanisme de lyse colloïdale comme l'ont proposé Knowles et Ellar (1987) pour expliquer comment les toxines du bacille de Thuringe endommagent les cellules qui leur sont sensibles. Or ce mécanisme suppose une entrée massive de solutés dans les vésicules qui ne soit pas compensée par une sortie équivalente. Dans une cellule, une bonne part de l'osmolarité dépend de la présence de macromolécules trop volumineuses pour diffuser au travers des pores formés par les toxines, mais les liposomes utilisés dans les expériences décrites dans ce mémoire ne contiennent, mise à part la carboxyfluorescéine, que de petits solutés hydrophiles. Leur efflux devrait compenser au moins en grande partie l'effet osmotique de l'influx de solutés.

Enfin, les toxines pourraient former des pores dans la membrane. Ce mécanisme offre, au moins dans le cas de la Cry6Aa1, l'avantage d'être en accord avec les résultats des études réalisées avec des bicouches lipidiques (Forte et al. 2016) en plus de correspondre au mécanisme d'action bien documenté pour un grand nombre de toxines produites par *B. thuringiensis* (Vachon et al. 2012). Il semble, par contre, improbable que la carboxyfluorescéine puisse tout simplement diffuser au travers des pores formés par ces toxines étant donné ses propriétés physicochimiques.

Les liposomes en suspension dans la solution de glucose laissent sortir la sonde fluorescente lorsqu'ils sont perméabilisés, en absence de toxine, avec la valinomycine, un ionophore spécifique pour le potassium (Figure 17). La carboxyfluorescéine peut donc traverser la membrane en diffusant au travers de la bicouche lipidique à condition que la toxine forme des pores qui permettent la diffusion des petits ions (cations et anions) et assurent la neutralité du flux.

Bien que seulement 0.05% de la sonde se retrouve sous sa forme neutre à pH 7.5, cette valeur représente un grand nombre de molécules. Les molécules neutres peuvent passer beaucoup plus efficacement au travers d'une bicouche lipidique que les molécules chargées, et ce, sans perturber cette dernière. Comme il s'agit d'un équilibre dynamique, le système tend à revenir vers les pourcentages d'équilibre. Une partie de la sonde dans les liposomes devient neutre et la majorité de la sonde qui a traversé la membrane devient chargée, créant un potentiel membranaire. Les pores formés par la toxine permettent aux ions de traverser et d'équilibrer ce potentiel.

4.2. Propriétés des pores formés par les toxines

Les toxines étudiées dans le présent travail ont fait jusqu'ici l'objet de peu d'analyses fonctionnelles. La formation des pores dans des bicouches lipidiques par la Cry6Aa1 a été caractérisée (Forte et al. 2016) en même temps que les expériences résumées dans ce mémoire ont été réalisées, alors que la toxine binaire DS10/DS11 n'avait fait auparavant

l'objet d'aucune étude fonctionnelle, mis à part quelques tests de toxicité envers les larves de la chrysomèle.

4.2.1. Cry6Aa1

Dans les liposomes géants, l'activité de la Cry6Aa1 est détectée à partir de 2 $\mu\text{g/ml}$ alors qu'en bicouches lipidiques planes, il est possible de détecter une activité à des concentrations souvent inférieures à 1 ng/ml selon les conditions expérimentales (Fortea et al. 2016). Cette différence de concentration peut sembler énorme, mais la toxine doit former des pores dans une grande proportion des liposomes pour avoir un effet détectable, alors qu'en bicouches lipidiques, on cherche plutôt à détecter la formation de canaux unitaires. La concentration maximale utilisée pour nos expériences est de 20 $\mu\text{g/ml}$. Cette dose correspond à légèrement plus de 5 fois la concentration maximale de toxine utilisée dans les expériences de fluorescence (Kirouac et al. 2003) ou de diffusion de lumière (Carroll et Ellar 1993; Coux et al. 2001) réalisées avec des vésicules de membrane à bordure en brosse intestinales provenant d'un insecte sensible à la toxine étudiée. Dans de telles expériences, il y a des récepteurs membranaires qui jouent un rôle important, et la toxine est incubée avec les vésicules pendant 60 minutes avant le début de l'expérience. L'efficacité de la Cry6Aa1 est donc comparable à celle des autres toxines Cry étudiées jusqu'à présent. Il reste à voir si son efficacité ne pourrait pas être accrue substantiellement par la présence d'un récepteur.

Il est également intéressant, et tout à fait nouveau, de découvrir que la Cry6Aa1 n'a pas besoin d'être activée pour perméabiliser les membranes dans les études de bicouches lipidiques (Fortea et al. 2016) ou dans les liposomes. La toxine binaire DS10/DS11 partage

cette propriété particulière dans les liposomes, mais n'a pas encore été testée, au moment de rédiger ce mémoire, en bicouches lipidiques. Les travaux portant sur les autres toxines Cry ont montré que l'activation est une étape importante pour la toxicité (voir le Chapitre 1 Section 1.2.3.3). Puisque la DS10/DS11 perméabilise les liposomes sans nécessiter une activation, aucune expérience avec des protéases n'a été effectuée. Il serait cependant intéressant de traiter cette toxine binaire avec du suc intestinal provenant de la chrysomèle pour vérifier si son efficacité n'en serait pas améliorée. Pour la Cry6Aa1, lorsque la toxine est traitée avec le suc intestinal, les produits de cette digestion sont aussi actifs que la toxine native à 20 µg/ml. Il serait souhaitable de compléter cet aspect de l'étude en faisant varier la concentration de toxine utilisée, ce qui n'a pas été possible jusqu'à présent en raison de la quantité limitée de toxine traitée disponible.

L'activité de la Cry6Aa1 a été réduite considérablement par le traitement à la trypsine (Figure 22) même si cette enzyme est souvent utilisée pour l'activation in vitro des toxines Cry. Ce résultat n'est cependant peut-être pas très surprenant étant donné qu'il y a très peu de trypsine dans l'intestin de la chrysomèle. Celle-ci ne contribue qu'à environ 3% de l'ensemble de l'activité protéolytique de l'intestin (Kaiser-Alexnat 2009). Par contre, la trypsine pourrait jouer un rôle plus important chez le nématode, ce qui expliquerait, au moins en partie, pourquoi la Cry6Aa1 trypsinisée a pris autant d'importance dans les études cristallographiques (Dementiev et al. 2016; Huang et al. 2016). Notons que l'activation des toxines utilisées pour le biocontrôle des nématodes a fait l'objet de peu d'études. Parce que ces animaux se nourrissent de bactéries, les expériences de toxicité sont habituellement

réalisées en exprimant les toxines dans les souches d'*E. coli* utilisées pour leur élevage et ne nécessitent donc pas d'activation in vitro. Les résultats du présent travail suggèrent néanmoins que le rôle de la trypsine dans l'activation des protéines toxiques pour les nématodes devrait être revu, au moins pour la Cry6Aa1.

Les pores formés par la toxine binaire DS10/DS11 montrent une sélectivité cationique étant donné que l'expérience effectuée dans le glucose (gradient sortant de potassium de 145 mM) comme tampon a montré une perméabilisation importante (Figure 24E) alors que lorsque le gradient sortant de potassium est plus faible, comme l'expérience effectuée dans le KCl (gradient sortant de potassium de 38 mM), le largage de sonde est plus faible (Figure 24A). Cette expérience montre également que cette toxine peut former des pores lorsque la force ionique est d'environ 20 mM (10 mM Hepes et 10 mM Tris). La force ionique du milieu a donc peu d'influence sur l'activité de la toxine binaire. Des expériences de diffusion de lumière ont montré que d'autres toxines Cry peuvent former des pores dans des conditions similaires de force ionique (Kirouac et al. 2002). Cette toxine semble donc agir similairement aux autres toxines Cry. La même expérience effectuée pour la Cry6Aa1 n'a pas révélé de perméabilisation pour des liposomes injectés dans le glucose (Figure 16E). Il existe deux possibilités pour expliquer cette absence de perméabilisation. Les pores formés par la toxine peuvent être sélectifs aux anions ou l'absence de force ionique suffisamment élevée dans cette expérience pourrait empêcher la toxine de perméabiliser les liposomes. Dans les deux cas, cette expérience indique que cette toxine a des propriétés particulières comparée aux autres toxines Cry étudiées jusqu'à présent.

Dans une première tentative pour tester laquelle de ces hypothèses est valide, le glucose a été remplacé par une molécule zwitterionique, la L-alanine (qui possède une charge positive et une charge négative pour former une molécule globalement neutre). Ainsi la quantité de charges présentes dans la solution est grandement augmentée. Le résultat de cette expérience (Figure 16F) est similaire à ceux qui ont été obtenus avec la solution de glucose. Après avoir effectué cette expérience, nous avons constaté que puisque les charges sont sur la même molécule, la force ionique n'a pas été augmentée. En effet, on ne peut pas considérer qu'une molécule zwitterionique contribue à la force ionique (Stellwagen, Prantner et Stellwagen 2008). Cette tentative a permis d'imaginer une expérience qui pourrait être effectuée afin de départager ces hypothèses. Il faudrait préparer des liposomes comme mentionné dans le Chapitre 2 (Section 2.8), mais en incubant les liposomes avec la toxine avant d'effectuer la chromatographie. Dans cette expérience, la toxine pourrait former des pores en présence d'une force ionique élevée sans que le contenu intravésiculaire (égal de part et d'autre de la membrane) ne se perde. Après cette préincubation avec la toxine, les liposomes pourraient subir la chromatographie en changeant le tampon de colonne pour une solution de 214 mM de glucose, 10 mM Hepes/Tris, pH 7,5. La mesure de fluorescence se ferait normalement après la chromatographie dans la solution de KCl. Si les pores se forment grâce à la force ionique élevée, une partie de la sonde (environ 70% comme estimé dans la section résultat) va s'échapper des liposomes pendant la chromatographie, et la détection de la fluorescence sera diminuée dans les liposomes. Si les pores sont anioniques, la sonde restera dans les liposomes pendant la chromatographie, et il sera possible de détecter sa fluorescence normalement.

Comme il a été mentionné dans le Chapitre 1 (Section 1.2.4.2), la structure de la Cry6Aa1 est très différente de celle des autres toxines Cry. Elle est complètement différente des toxines à trois domaines comme la Cry1Aa1. Sa forme allongée et sa constitution en hélices α font en sorte qu'elle ressemble à deux toxines produites par *B. cereus*, une bactérie très similaire à *B. thuringiensis*, et à une toxine produite par *E. coli*. Cette dernière toxine, l'hémolysine E (ClyA) a été étudiée de façon très détaillée (Hunt et al. 2010; Benke et al. 2015). La structure de la toxine ClyA native a été élucidée (Figure 31B) (Wallace et al. 2000) ainsi que celle du pore qu'elle forme dans les membranes (Wallace et al. 2000; Mueller et al. 2009). Les changements de conformation qu'elle subit pour s'insérer dans les membranes ont donc pu être analysés (Eifler et al. 2006; Tzokov et al. 2006; Mueller et al. 2009; Vaidyanathan et al. 2014). Il est possible que la Cry6Aa1 subissent des changements de configuration similaires à cette toxine afin de pouvoir s'insérer dans la membrane. Il serait souhaitable de s'inspirer de ces connaissances pour planifier des expériences futures qui permettraient d'approfondir nos connaissances sur les relations structure-fonction de la Cry6Aa1.

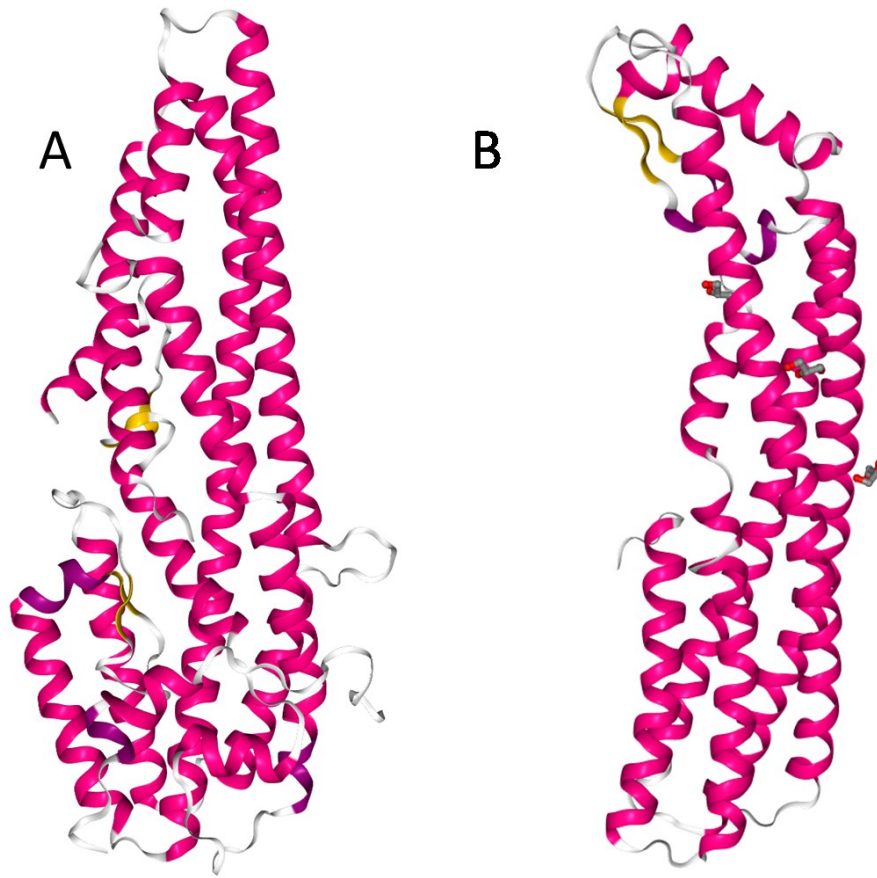


Figure 31 Comparaison de la structure de la Cry6Aa1 (5KUC) (A) et de l'hémolysine E (4PHQ) (B)

La présence de cholestérol n'améliore pas la capacité de la Cry6Aa1 à former des pores dans nos liposomes géants. Bien au contraire, elle a réduit son activité comme il est montré à la figure 21. Cet effet du cholestérol est surprenant puisque pour l'hémolysine E de *E. coli*, il a été démontré auparavant que sa présence stimule la formation de pores. De plus, l'activité de la Cry1Aa dans les bicouches lipidiques est similaire en présence (Grochulski et al. 1995) ou en absence (Peyronnet et al. 2001) de cholestérol dans des membranes lipidiques planes. La combinaison de ces facteurs montre qu'il reste encore beaucoup à découvrir au sujet de la Cry6Aa1.

4.2.2. DS10/11

Bien que la toxine binaire perméabilise très bien les liposomes, seule la DS10 a eu un effet détectable lorsque testée individuellement. De plus, il a été impossible de recréer l'effet de la toxine binaire, que ce soit en mélangeant ses constituants juste avant l'expérience, 20 heures avant l'expérience, ou en ajoutant 5 mM de dithiothréitol pour créer des conditions réductrices (Figures 28, 29 et 30). Il est possible que ce problème résulte du fait que la DS11 et la DS12 aient été produites dans *P. fluorescens* alors que la toxine binaire DS10/DS11 et la DS10 proviennent de *B. thuringiensis*. Toutes ces protéines étant originaires de *B. thuringiensis*, la qualité de l'expression des toxines pourrait possiblement y être plus grande même si la production des toxines du bacille de Thuringe dans *P. fluorescens* est habituellement très efficace et fiable. Par exemple, toutes les expériences réalisées avec la Cry6Aa1 utilisaient de la toxine produite dans ce système d'expression. Quoiqu'il en soit, la DS11 est présentement en voie d'être produite dans *B. thuringiensis*, ce qui va bientôt permettre de refaire les expériences de reconstitution de la toxine binaire et de tester la possibilité que la production de la DS11 fasse exception et soit effectivement incompatible avec le système d'expression de *P. fluorescens*.

Toutes les expériences présentées ici ont été effectuées à pH 7,5. Il existe plusieurs raisons pour ce choix : la carboxyfluorescéine perd sa fluorescence à pH acide, les expériences effectuées en bicouches lipidiques n'ont montré qu'une très légère influence du pH au niveau des canaux unitaires (Forte et al. 2016), et la majorité des travaux en vésicules de bordure en brosse et liposomes sur les toxines Cry ont été effectués à ce pH aussi bien dans

notre laboratoire qu'ailleurs. Il serait néanmoins intéressant d'effectuer des expériences de fluorescence à différents pH puisque le pH intestinal des insectes cibles varie tout au long de l'intestin et en fonction de l'activité (repos, alimentation) de l'insecte. Pour y arriver, il faudra modifier le protocole expérimental afin d'utiliser la calcéine à la place de la carboxyfluorescéine, ce qui permettrait de travailler aux pH acides.

4.3. Perspectives

Il a été possible de développer une nouvelle méthode permettant d'étudier facilement les nouvelles toxines bactériennes en utilisant des liposomes géants composés de 90% de phosphatidylcholine et 10% de phosphatidylglycérol et chargés avec la sonde fluorescente carboxyfluorescéine. Les études effectuées jusqu'à présent n'ont cependant pas permis d'incorporer des récepteurs membranaires dans les liposomes. Bien que cela risque d'être difficile à effectuer, il serait important de poursuivre ces travaux afin d'incorporer du matériel provenant de la membrane intestinale de *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte dans les liposomes géants. Une fois au point, cette approche pourrait, au moins en principe, être utilisée pour réaliser des expériences avec du matériel membranaire provenant de n'importe quel insecte.

La nouvelle technique développée dans le présent travail a quand même permis de mieux comprendre le mode d'action de deux nouvelles toxines parmi les plus prometteuses pour la lutte contre la chrysomèle des racines du maïs. Ce système pourrait être utile pour caractériser d'autres toxines, notamment les toxines Cyt dont le mode d'action est beaucoup

moins bien connu que celui des toxines Cry. Il existe deux grandes hypothèses pour expliquer comment ces toxines tuent les cellules : formation de pores (Knowles et al. 1989) et déstabilisation des membranes (Manceva et al. 2005). Des expériences semblables à celles qui sont décrites dans ce mémoire pourraient aider à trancher entre ces deux possibilités et résoudre un débat qui perdure depuis longtemps.

Puisque les toxines étudiées dans ce travail n'ont pas été étudiées en présence de récepteurs membranaires, ces derniers restent inconnus et seuls les bio-essais effectués par nos collaborateurs de chez Dow Agrosience permettront d'identifier si ces toxines pourront être utilisées comme pesticides. Il est toutefois intéressant de noter que la plupart de toxines utilisées comme insecticides ont été homologuées bien avant qu'on en connaisse les récepteurs. Par exemple, les toxines de *B. thuringiensis* var. *israelensis* sont utilisées à très grande échelle depuis des décennies même si l'identification de leurs récepteurs n'a débuté que récemment et est probablement loin d'être complétée.

5. Références

- Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H. et Kinoshita, K. (1996). Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophysical Journal*, 71(6), 3242-3250. doi:10.1016/S0006-3495(96)79517-6
- Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H. et Kinoshita, K. (1998). Formation of giant liposomes promoted by divalent cations: critical role of electrostatic repulsion. *Biophysical Journal*, 74(6), 2973-2982. doi:10.1016/S0006-3495(98)78004-X
- Akiba, T., Abe, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Ito, A., Ichimatsu, T., Katayama, H., Akao, T., Higuchi, K., Mizuki, E., Ohba, M., Kanai, R. et Harata, K. (2009). Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *Journal of Molecular Biology*, 386(1), 121-133. doi:10.1016/j.jmb.2008.12.002
- Akiba, T., Higuchi, K., Mizuki, E., Ekino, K., Shin, T., Ohba, M., Kanai, R. et Harata, K. (2006). Nontoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* demonstrates a remarkable structural similarity to β -pore-forming toxins. *Proteins*, 63, 243-248. doi:10.1002/prot.20843
- Akiba, T. et Okumura, S. (2016). Parasporins 1 and 2: Their structure and activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, Sous presse. doi:10.1016/j.jip.2016.10.005
- Angus, T. A. (1954). A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. *Nature*, 173, 545-546. doi:10.1038/173545a0
- Angus, T. A. (1956). Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. *Canadian Journal of Microbiology*, 2, 122-131.
- Aronson, A. I. et Shai, Y. (2001). Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: Unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 195(1), 1-8. doi:10.1016/S0378-1097(00)00552-8
- Aschi, M., D'Archivio, A. A., Fontana, A. et Formiglio, A. (2008). Physicochemical properties of fluorescent probes: Experimental and computational determination of the overlapping pK_a values of carboxyfluorescein. *The Journal of Organic Chemistry*, 73(3), 3411-3417. doi:10.1021/jo800036z
- Becker, N. (2000). Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*, 383-398.
- Beegle, C. C. et Yamamoto, T. (1992). History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Canadian Entomologist*, 124, 587-616.
- Benke, S., Roderer, D., Wunderlich, B., Nettels, D., Glockshuber, R. et Schuler, B. (2015). The assembly dynamics of the cytolytic pore toxin ClyA. *Nature Communications*, 6, 6198. doi:10.1038/ncomms7198
- Bietlot, H. P., Vishnubhatla, I., Carey, P. R., Pozsgay, M. et Kaplan, H. (1990). Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *The Biochemical Journal*, 267(2), 309-15.

- Bischofberger, M., Iacovache, I. et Van Der Goot, F. G. (2012). Pathogenic pore-forming proteins: Function and host response. *Cell Host and Microbe*, 12(3), 266-275. doi:10.1016/j.chom.2012.08.005
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J. et Li, J. (2005). Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of Molecular Biology*, 348(2), 363-382. doi:10.1016/j.jmb.2005.02.013
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C. et Lescar, J. (2006). Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *Journal of Bacteriology*, 188(9), 3391-3401. doi:10.1128/JB.188.9.3391-3401.2006
- Bravo, A., Gill, S. S. et Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.022
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S. et Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), 423-431. doi:10.1016/j.ibmb.2011.02.006
- Bulla, L. A., Bechtel, D. B., Kramer, K. J., Shethna, Y. I., Aronson, A. I. et Fitz-James, P. C. (1980). Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Critical Reviews in Microbiology*, 8(2), 147-204. doi:10.3109/10408418009081124
- Butko, P. (2003). Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: Data and hypotheses. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/AEM.69.5.2415-2422.2003
- Cannon, R. J. C. (2000). Bt transgenic crops: Risks and benefits. *Integrated Pest Management Reviews*, 5(3), 151-173. doi:10.1023/A:1011347122894
- Carroll, J. et Ellar, D. J. (1993). An analysis of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *European Journal of Biochemistry*, 214(3), 771-778.
- Chakroun, M., Banyuls, N., Bel, Y., Escriche, B. et Ferré, J. (2016). Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80, 329-350.
- Chattopadhyay, A., Bhatnagar, N. B. et Bhatnagar, R. (2004). Bacterial insecticidal toxins. *Critical Reviews in Microbiology*, 30, 33-54. doi:10.1080/10408410490270712
- Chu, C. C., Zavala, J. A., Spencer, J. L., Curzi, M. J., Fields, C. J., Drnevich, J., Siegfried, B. D. et Seufferheld, M. J. (2015). Patterns of differential gene expression in adult rotation-resistant and wild-type western corn rootworm digestive tracts. *Evolutionary Applications*, 8(7), 692-704. doi:10.1111/eva.12278
- Cohen, S., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M., Zaritsky, A. et Dym, O. (2011). Cyt1Aa toxin: Crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. *Journal of Molecular Biology*, 413(4), 804-814. doi:10.1016/j.jmb.2011.09.021

- Cohen, S., Dym, O., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M. et Zaritsky, A. (2008). High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Molecular Biology*, 380(5), 820-827. doi:10.1016/j.jmb.2008.05.010
- Coux, F., Vachon, V., Rang, C., Moozar, K., Masson, L., Royer, M., Bes, M., Rivest, S., Brousseau, R., Schwartz, J.-L., Laprade, R. et Frutos, R. (2001). Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35546-35551. doi:10.1074/jbc.M101887200
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. et Zeigler, D. R. (2016). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Repéré 28 octobre 2016, à <http://www.btnomenclature.info/>
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, H. E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. et Dean, D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 807-813. doi:10.1092-2172/98
- Curzi, M. J., Zavala, J. A., Spencer, J. L. et Seufferheld, M. J. (2012). Abnormally high digestive enzyme activity and gene expression explain the contemporary evolution of a *Diabrotica* biotype able to feed on soybeans. *Ecology and Evolution*, 2(8), 2005-2017. doi:10.1002/ece3.331
- Dal Peraro, M. et van der Goot, F. G. (2016). Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(2), 77-92. doi:10.1038/nrmicro.2015.3
- de Barjac, H. et Bonnefoi, A. (1962). Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. *Entomophaga*, 7, 5-31.
- de Barjac, H. et Frachon, E. (1990). Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*, 35(2), 233-240. doi:10.1007/BF02374798
- de Maagd, R. A., Bakker, P., Staykov, N., Dukiandjiev, S., Stiekema, W. et Bosch, D. (1999). Identification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III amino acid residues involved in insect specificity. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4369-4374.
- de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. et Schnepf, H. E. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*, 37, 409-433. doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143042
- de Maagd, R. A., Kwa, M. S. G., Van Klei, H. Der, Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J. M., Stiekema, W. J. et Bosch, D. (1996). Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1537-1543.

- Dementiev, A., Board, J., Sitaram, A., Hey, T., Kelker, M. S., Xu, X., Hu, Y., Vidal-Quist, C., Chikwana, V., Griffin, S., McCaskill, D., Wang, N. X., Hung, S.-C., Chan, M. K., Lee, M. M., Hughes, J., Wegener, A., Aroian, R. V., Narva, K. E. et Berry, C. (2016). The pesticidal Cry6Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* is structurally similar to HlyE-family alpha pore-forming toxins. *BioMed Central Biology*, 14(1), 71. doi:10.1186/s12915-016-0295-9
- Denolf, P., Hendrickx, K., Van Damme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D. et Van Rie, J. (1997). Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *European Journal of Biochemistry*, 248(3), 748-761.
- Dorsch, J. A., Candas, M., Griko, N. B., Maaty, W. S. A., Midboe, E. G., Vadlamudi, R. K. et Bulla, L. A. (2002). Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R1 in *Manduca sexta*: Involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(9), 1025-1036. doi:10.1016/S0965-1748(02)00040-1
- Dow, J. A. T. (1987). Insect midgut function. *Advances in Insect Physiology*, 19, 187-328. doi:10.1016/S0065-2806(08)60102-2
- Eifler, N., Vetsch, M., Gregorini, M., Ringler, P., Chami, M., Philippsen, A., Fritz, A., Müller, S. a, Glockshuber, R., Engel, A. et Grauschopf, U. (2006). Cytotoxin ClyA from *Escherichia coli* assembles to a 13-meric pore independent of its redox-state. *EMBO Journal*, 25(11), 2652-2661. doi:10.1038/sj.emboj.7601130
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A. et Koziel, M. G. (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 5389-5394. doi:10.1073/pnas.93.11.5389
- Evdokimov, A. G., Moshiri, F., Sturman, E. J., Rydel, T. J., Zheng, M., Seale, J. W. et Franklin, S. (2014). Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals. *Protein Science*, 23(11), 1491-1497. doi:10.1002/pro.2536
- Federici, B. A. (2005). Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89(1), 30-38. doi:10.1016/j.jip.2005.06.007
- Federici, B. A., Park, H. et Bideshi, D. K. (2010). Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. *The Open Toxinology Journal*, 3, 83-100.
- Fernandez, L. E., Aimanova, K. G., Gill, S. S., Bravo, A. et Soberón, M. (2006). A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *The Biochemical Journal*, 394(Pt 1), 77-84. doi:10.1042/BJ20051517

- Fernandez, L. E., Martinez-Anaya, C., Lira, E., Chen, J., Evans, A., Hernández-Martánez, S., Lanz-Mendoza, H., Bravo, A., Gill, S. S. et Soberón, M. (2009). Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *edes aegypti*. *Biochemistry*, 48(37), 8899-8907. doi:10.1021/bi900979b
- Ferré, J., Van Rie, J. et MacIntosh, S. C. (2008). Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM). *Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs*. Springer, Pays-Bas, 41-85.
- Fortea, E., Lemieux, V., Potvin, L., Chikwana, V., Griffin, S., Hey, T., Mccaskill, D., Narva, K., Tan, S. Y., Xu, X. et Vachon, V. (2016). Cry6Aa1, a *Bacillus thuringiensis* nematocidal and insecticidal toxin, forms pores in planar lipid bilayers at extremely low concentrations and without the need of proteolytic processing. *Article soumis au Journal of Biological Chemistry*.
- Fujii, S., Matsuura, T. et Yomo, T. (2015). Membrane curvature affects the formation of α -hemolysin nanopores. *ACS Chemical Biology*, 10(7), 1694-1701. doi:10.1021/acscchembio.5b00107
- Gahan, L. J., Pauchet, Y., Vogel, H. et Heckel, D. G. (2010). An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genetics*, 6(12). doi:10.1371/journal.pgen.1001248
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J. R., Pangborn, W. et English, L. (2001). Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 57(8), 1101-1109. doi:10.1107/S0907444901008186
- Ganash, M., Phung, D., Sedelnikova, S. E., Lindbäck, T., Granum, P. E. et Artymiuk, P. J. (2013). Structure of the NheA component of the Nhe toxin from *Bacillus cereus*: Implications for function. *PLoS ONE*, 8(9). doi:10.1371/journal.pone.0074748
- Garczynski, S. F., Crim, J. W. et Adang, M. J. (1991). Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein blot analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(10), 2816-2820.
- George, S. G. et Kenny, J. (1973). Studies on the enzymology of purified preparations of brush border from rabbit kidney. *The Biochemical Journal*, 134(1), 43-57.
- Gómez, I., Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Fernandez, L. E., Pérez, C., Sánchez, J., Soberón, M. et Bravo, A. (2007). Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 28(1), 169-173. doi:10.1016/j.peptides.2006.06.013
- Gonçalves, C., Vachon, V., Schwartz, J.-L. et Dubreuil, J. D. (2007). The *Escherichia coli* enterotoxin STb permeabilizes piglet jejunal brush border membrane vesicles. *Infection and Immunity*, 75(5), 2208-2213. doi:10.1128/IAI.01829-06
- González-Cabrera, J., García, M., Hernández-Crespo, P., Farinós, G. P., Ortego, F. et Castañera, P. (2013). Resistance to Bt maize in *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) is mediated by alteration in Cry1ab protein activation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(8), 635-643. doi:10.1016/j.ibmb.2013.04.001

- Gonzalez, M. R., Bischofberger, M., Pernot, L., van der Goot, F. G. et Frêche, B. (2008). Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(3), 493-507. doi:10.1007/s00018-007-7434-y
- Gray, M. E., Sappington, T. W., Miller, N. J., Moeser, J. et Bohn, M. O. (2009). Adaptation and invasiveness of western corn rootworm: intensifying research on a worsening pest. *Annual Reviews in Entomology*, 54, 303-321. doi:10.1146/annurev.ento.54.110807.090434
- Griffitts, J. S., Haslam, S. M., Yang, T., Garczynski, S. F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P. S., Dell, A., Adang, M. J. et Aroian, R. V. (2005). Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science*, 307, 922-925. doi:10.1126/science.1104444
- Griffitts, J. S., Huffman, D. L., Whitacre, J. L., Barrows, B. D., Marroquin, L. D., Müller, R., Brown, J. R., Hennet, T., Esko, J. D. et Aroian, R. V. (2003). Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 45594-45602. doi:10.1074/jbc.M308142200
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.-L., Brousseau, R. et Cygler, M. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: Crystal structure and channel formation. *Journal of Molecular Biology*, 254(3), 447-464. doi:10.1006/jmbi.1995.0630
- Groulx, N., Juteau, M. et Blunck, R. (2010). Rapid topology probing using fluorescence spectroscopy in planar lipid bilayer : The pore-forming mechanism of the toxin Cry1Aa of *Bacillus thuringiensis*, 497-513. doi:10.1085/jgp.200910347
- Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., Song, F., Zhang, J., Wu, X., Huang, D. et Rao, Z. (2009). Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *Journal of Structural Biology*, 168(2), 259-266. doi:10.1016/j.jsb.2009.07.004
- Haider, M. Z., Knowles, B. H. et Ellar, D. J. (1986). Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal δ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *European Journal of Biochemistry*, 156(3), 531-540. doi:10.1111/j.1432-1033.1986.tb09612.x
- Han, S., Craig, J. A., Putnam, C. D., Carozzi, N. B. et Tainer, J. A. (1999). Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. *Nature Structural Biology*, 6(10), 932-936. doi:10.1038/13300
- Hill, R. (1975). Mating, oviposition patterns, fecundity and longevity of the western corn rootworm. *Journal of Economic Entomology*, 68(3), 311-315.
- Hofmann, C., Lüthy, P., Hütter, R. et Pliska, V. (1988). Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *European Journal of Biochemistry*, 173, 85-91.

- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S. et Van Mellaert, H. (1988). Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(21), 7844-7848. doi:10.1073/pnas.85.21.7844
- Höfte, H. et Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53(2), 242-55.
- Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G. et Cullis, P. R. (1985). Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta*, 812(1), 55-65. doi:10.1016/0005-2736(85)90521-8
- Hua, G., Jurat-Fuentes, J. L. et Adang, M. J. (2004a). Bt-R1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 28051-28056. doi:10.1074/jbc.M400237200
- Hua, G., Jurat-Fuentes, J. L. et Adang, M. J. (2004b). Fluorescent-based assays establish *Manduca sexta* Bt-R1a cadherin as a receptor for multiple *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(3), 193-202. doi:10.1016/j.ibmb.2003.10.006
- Huang, J., Guan, Z., Wan, L., Zou, T. et Sun, M. (2016). Crystal structure of Cry6Aa: A novel nematocidal ClyA-type α -pore-forming toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(1), 307-313. doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.002
- Hui, F., Scheib, U., Hu, Y., Sommer, R. J., Aroian, R. V. et Ghosh, P. (2012). Structure and glycolipid binding properties of the nematocidal protein Cry5B. *Biochemistry*, 51(49), 9911-9921. doi:10.1021/bi301386q
- Hunt, S., Green, J. et Artymiuik, P. J. (2010). Hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA) and related toxins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 677, 116-126. doi:10.1007/978-1-4419-6327-7_10
- James, C. (2015). 20th Anniversary (1995 to 2015) of the global commercialization of biotech crops and biotech crops highlights in 2015. *ISAAA Brief*, 51.
- Jordão, B. P., Terra, W. R. et Ferreira, C. (1995). Chemical determinations in microvillar membranes purified from brush-borders isolated from the larval midgut of one coleoptera and two diptera species. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(4), 417-426. doi:10.1016/0965-1748(94)00073-8
- Jurat-Fuentes, J. L. et Adang, M. J. (2004). Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *European Journal of Biochemistry*, 271(15), 3127-3135. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04238.x
- Jurat-Fuentes, J. L. et Adang, M. J. (2006). Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(3), 166-171. doi:10.1016/j.jip.2006.01.010

- Jurat-Fuentes, J. L., Karumbaiah, L., Jakka, S. R. K., Ning, C., Liu, C., Wu, K., Jackson, J., Gould, F., Blanco, C., Portilla, M., Perera, O. et Adang, M. (2011). Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE*, 6(3). doi:10.1371/journal.pone.0017606
- Kaiser-Alexnat, R. (2009). Protease activities in the midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(3), 169-174. doi:10.1016/j.jip.2009.01.003
- Kelker, M. S., Berry, C., Evans, S. L., Pai, R., McCaskill, D. G., Wang, N. X., Russell, J. C., Baker, M. D., Yang, C., Pflugrath, J. W., Wade, M., Wess, T. J. et Narva, K. E. (2014). Structural and biophysical characterization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1. *PLoS ONE*, 9(11). doi:10.1371/journal.pone.0112555
- Kirouac, M., Vachon, V., Fortier, M., Trudel, M.-C., Berteloot, A., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2006). A mechanical force contributes to the « osmotic swelling » of brush-border membrane vesicles. *Biophysical Journal*, 91(9), 3301-3312. doi:10.1529/biophysj.106.088641
- Kirouac, M., Vachon, V., Noël, J. F., Girard, F., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2002). Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1561(2), 171-179. doi:10.1016/S0005-2736(02)00342-5
- Kirouac, M., Vachon, V., Rivest, S., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2003). Analysis of the properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins using a potential-sensitive fluorescent probe. *Journal of Membrane Biology*, 196(1), 51-59. doi:10.1007/s00232-003-0624-0
- Knight, P. J. K., Crickmore, N. et Ellar, D. J. (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) δ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molecular Microbiology*, 11, 429-436.
- Knight, P. J. K., Knowles, B. H. et Ellar, D. J. (1995). Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 270(30), 17765-17770. doi:10.1074/jbc.270.30.17765
- Knowles, B. H. (1994). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Advances in Insect Physiology*, 24, 275-308.
- Knowles, B. H., Blatt, M. R., Tester, M., Horsnell, J. M., Carroll, J., Menestrina, G. et Ellar, D. J. (1989). A cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *FEBS Letters*, 244(2), 259-262. doi:10.1016/0014-5793(89)80540-X
- Knowles, B. H. et Dow, J. A. T. (1993). The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays*, 15(7), 469-476. doi:10.1002/bies.950150706
- Knowles, B. H. et Ellar, D. J. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 924, 509-518.

- Koepsell, H. (1986). Methodological aspects of purification and reconstitution of transport proteins from mammalian plasma membranes. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 104, 65-137.
- Koepsell, H. et Seibicke, S. (1990). Reconstitution and fractionation of renal brush border transport proteins. *Methods in Enzymology*, 191, 583-605.
- Koller, C. N., Bauer, L. S. et Hollingworth, R. M. (1992). Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native δ -endotoxin crystals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184(2), 692-699. doi:10.1016/0006-291X(92)90645-2
- Lacey, L. A. et Undeen, A. H. (1986). Microbial control of black flies and mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 31, 265-296. doi:10.1146/annurev.ento.31.1.265
- Lecadet, M.-M. (1996). La lutte bactériologique contre les insectes: une vieille histoire très actuelle. *Annales de l'Institut Pasteur / Actualités*, 7(4), 207-216. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0924-4204(97)86390-1
- Lecadet, M.-M., Frachon, E., Cosmao Dumanoir, V., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P. et Thiéry, I. (1999). Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 86(4), 660-672. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00710.x
- Lee, M. K., Walters, F. S., Hart, H., Palekar, N. et Chen, J.-S. (2003). The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4648-4657. doi:10.1128/AEM.69.8.4648-4657.2003
- Lehane, M. J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, 42, 525-550.
- Leuber, M., Orlik, F., Schiffler, B., Sickmann, A. et Benz, R. (2006). Vegetative insecticidal protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: Evidence for oligomer and channel formation. *Biochemistry*, 45(1), 283-288. doi:10.1021/bi051351z
- Levine, E. et Oloumi-Sadeghi, H. (1991). Management of diabroticite rootworms in corn. *Annual Review of Entomology*, 36, 229-255.
- Levine, E., Spencer, J. L., Isard, S. A., Onstad, D. W. et Gray, M. E. (2002). Adaptation of the western corn rootworm to crop rotation: Evolution of a new strain in response to a management practice. *American Entomologist*, 107, 48-94.
- Li, J., Carroll, J. et Ellar, D. J. (1991). Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353, 815-821.
- Li, J., Derbyshire, D. J., Promdonkoy, B. et Ellar, D. J. (2001). Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 4), 571-7. doi:10.1042/BST0290571
- Li, J., Koni, P. A. et Ellar, D. J. (1996). Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *Journal of Molecular Biology*, 257(1), 129-152. doi:10.1006/jmbi.1996.0152

- Liang, Y., Patel, S. S. et Dean, D. H. (1995). Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 270(42), 24719-24724. doi:10.1074/jbc.270.42.24719
- Likitvivatanavong, S., Chen, J., Evans, A. M., Bravo, A., Soberon, M. et Gill, S. S. (2011). Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2829-2838. doi:10.1021/jf1036189
- Liu, M., Cai, Q. X., Liu, H. Z., Zhang, B. H., Yan, J. P. et Yuan, Z. M. (2002). Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 374-379. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01693.x
- Los, F. C. O., Randis, T. M., Aroian, R. V et Ratner, A. J. (2013). Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 173-207. doi:10.1128/MMBR.00052-12
- Luo, H., Xiong, J., Zhou, Q., Xia, L. et Yu, Z. (2013). The effects of *Bacillus thuringiensis* Cry6A on the survival, growth, reproduction, locomotion, and behavioral response of *Caenorhabditis elegans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(23), 10135-10142. doi:10.1007/s00253-013-5249-3
- MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P. M., Takeshita, K., Subbarao, N. K. et Hu, L. R. (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1061, 297-303. doi:10.1016/0005-2736(91)90295-J
- Madegowda, M., Eswaramoorthy, S., Burley, S. K. et Swaminathan, S. (2008). X-ray crystal structure of the B component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Proteins*, 71(2), 534-540. doi:10.1002/prot.21888
- Maître, J. L. et Heisenberg, C. P. (2013). Three functions of cadherins in cell adhesion. *Current Biology*, 23, 626-633. doi:10.1016/j.cub.2013.06.019
- Manceva, S. D., Pusztai-Carey, M., Russo, P. S. et Butko, P. (2005). A detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biochemistry*, 44(2), 589-597. doi:10.1021/bi048493y
- Masson, L., Schwab, G., Mazza, A., Brousseau, R., Potvin, L. et Schwartz, J.-L. (2004). A novel *Bacillus thuringiensis* (PS149B1) containing a Cry34Ab1/Cry35Ab1 binary toxin specific for the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte forms ion channels in lipid membranes. *Biochemistry*, 43(38), 12349-12357. doi:10.1021/bi048946z
- Masson, L., Tabashnik, B. E., Mazza, A., Préfontaine, G., Potvin, L., Brousseau, R. et Schwartz, J.-L. (2002). Mutagenic analysis of a conserved region of domain III in the Cry1ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 194-200. doi:10.1128/AEM.68.1.194-200.2002
- Metcalf. (1986). Foreword. Dans J. L. Krysan, T. A. Miller. *Methods for the Study of Pest Diabrotica*,. New York: Springer, 7-15.
- Miranda, R., Zamudio, F. Z. et Bravo, A. (2001). Processing of Cry1Ab δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: Role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(12), 1155-1163. doi:10.1016/S0965-1748(01)00061-3

- Morse, R. J., Yamamoto, T. et Stroud, R. M. (2001). Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*, 9(5), 409-417. doi:10.1016/S0969-2126(01)00601-3
- Mueller, M., Grauschopf, U., Maier, T., Glockshuber, R. et Ban, N. (2009). The structure of a cytolytic α -helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature*, 459(7247), 726-30. doi:10.1038/nature08026
- Navon, A. (2000). *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection - Reality and prospects. *Crop Protection*, 19(8-10), 669-676. doi:10.1016/S0261-2194(00)00089-2
- Ogiwara, K., Indrasith, L. S., Asano, S. et Hori, H. (1992). Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60(2), 121-126. doi:10.1016/0022-2011(92)90084-H
- Ohba, M., Mizuki, E. et Uemori, A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research*, 29(1), 427-433.
- Oppert, B. (1999). Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 42, 1-12. doi:10.1002/(Sici)1520-6327(199909)42:1<1::Aid-Arch2>3.0.Co;2-#
- Oppert, B., Kramer, K. J., Johnson, D. E., MacIntosh, S. C. et McGaughey, W. H. (1994). Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 198(3), 940-7. doi:10.1006/bbrc.1994.1134
- Oscarsson, J., Mizunoe, Y., Li, L., Lai, X. H., Wieslander, Å. et Uhlin, B. E. (1999). Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 32(6), 1226-1238. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01435.x
- Palma, L. et Berry, C. (2016). Understanding the structure and function of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon*, 109, 1-3. doi:10.1016/j.toxicon.2015.10.020
- Pardo-López, L., Soberón, M. et Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 3-22. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x
- Parish, C. R. (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology & Cell Biology*, 77(6), 499-508.
- Peyronnet, O., Nieman, B., Génèreux, F., Vachon, V., Laprade, R. et Schwartz, J.-L. (2002). Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin in planar lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1567, 113-122. doi:10.1016/S0005-2736(02)00605-3
- Peyronnet, O., Noulain, J. F., Laprade, R. et Schwartz, J.-L. (2004). Patch-clamp study of the apical membrane of the midgut of *Manduca sexta* larvae: Direct demonstration of endogenous channels and effect of a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Journal of Insect Physiology*, 50(9), 791-803. doi:10.1016/j.jinsphys.2004.05.013

- Peyronnet, O., Vachon, V., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2001). Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. *Journal of Membrane Biology*, 184(1), 45-54. doi:10.1007/s00232-001-0071-8
- Pigott, C. R. et Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 255-281. doi:10.1128/MMBR.00034-06
- Po, H. N. et Senozan, N. M. (2001). The Henderson-Hasselbalch Equation: Its History and Limitations. *Journal of Chemical Education*, 78(11), 1499-1503. doi:10.1021/ed078p1499
- Promdonkoy, B. et Ellar, D. J. (2003). Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *The Biochemical Journal*, 374(Pt 1), 255-259. doi:10.1042/BJ20030437
- Rajamohan, F., Lee, M. K. et Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: Molecular mode of action. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 60, 1-27. doi:10.1016/S0079-6603(08)60887-9
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D. et Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: An impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 18(5), 189-194. doi:10.1016/j.tim.2010.02.006
- Rees, J. S., Jarrett, P. et Ellar, D. J. (2009). Peritrophic membrane contribution to Bt Cry δ -endotoxin susceptibility in lepidoptera and the effect of calcofluor. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(3), 139-146. doi:10.1016/j.jip.2009.01.002
- Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., Ginzberg, I., Koncz-Kalman, Z., Koncz, C., Schell, J. et Zilberstein, A. (1996). Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3581-6.
- Richards, A. G. et Richards, P. A. (1977). The peritrophic membranes of insects. *Annual Review of Entomology*, 22, 219-240. doi:10.1146/annurev.en.22.010177.001251
- Sampson, M. N. et Gooday, G. W. (1998). Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology*, 144(8), 2189-2194. doi:10.1099/00221287-144-8-2189
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T. et Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), 283-300. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x
- Sanchis, V. (2011). From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: History of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(1), 217-231. doi:10.1051/agro/2010027
- Sanchis, V. et Bourguet, D. (2008). *Bacillus thuringiensis*: Applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 28(1), 11-20. doi:10.1051/agro:2007054

- Sangadala, S., Walters, F. S., English, L. H. et Adang, M. J. (1994). A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and $^{86}\text{Rb}^+ - \text{K}^+$ efflux in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 269(13), 10088 -10092.
- Sauka, D. H. et Benintende, G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: Generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(2), 124-140.
- Schnepf, H. E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. et Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775-806.
- Schnepf, H. E. et Whiteley, H. R. (1981). Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(5), 2893-7. doi:10.1007/s11033-008-9366-5
- Schwartz, J.-L., Garneau, L., Masson, L. et Brousseau, R. (1991). Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: Involvement of calcium and anionic channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1065(2), 250-260. doi:10.1016/0005-2736(91)90237-3
- Schwartz, J.-L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R. et Rousseau, E. (1993). Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *Journal of Membrane Biology*, 132, 53-62.
- Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2000). Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: Protein insertion and pore formation. *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*, 199-217, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-017-1429-7_11
- Schwartz, J.-L., Lu, Y. J., Söhnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L. et Adang, M. J. (1997a). Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Letters*, 412(2), 270-276. doi:10.1016/S0014-5793(97)00801-6
- Schwartz, J.-L., Potvin, L., Chen, X. J., Brousseau, R., Laprade, R. et Dean, D. H. (1997b). Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by CryIAa, a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3978-3984.
- Schwarz, G. et Arbuzova, A. (1995). Pore kinetics reflected in the dequenching of a lipid vesicle entrapped fluorescent dye. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1239, 51-57. doi:10.1016/0005-2736(95)00134-O
- Sharma, A., Kumar, S. et Bhatnagar, R. K. (2011). *Bacillus thuringiensis* protein Cry6B (BGSC ID 4D8) is toxic to larvae of *Hypera postica*. *Current Microbiology*, 62(2), 597-605. doi:10.1007/s00284-010-9749-4
- Shelton, A. M., Zhao, J. et Roush, R. T. (2002). Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Reviews in Entomology*, 47, 845-881. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145309

- Slatin, S. L., Abrams, C. K. et English, L. (1990). Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 169(2), 765-772. doi:10.1016/0006-291X(90)90397-6
- Smedley, D. P., Armstrong, G. et Ellar, D. J. (1997). Channel activity caused by a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin preparation depends on the method of activation. *Molecular Membrane Biology*, 14(1), 13-18.
- Smirnoff, W. A. (1971). Effect of chitinase on the action of *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Entomologist*, 103, 1829-1831. doi:10.4039/Ent1031829-12
- Smirnoff, W. A. (1977). Confirmations expérimentales du potentiel du complexe *Bacillus thuringiensis* et chitinase pour la répression de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Canadian Entomologist*, 109, 351-358.
- Soberón, M., Pardo, L., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Gómez, I., Porta, H. et Bravo, A. (2010). Pore formation by Cry toxins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 677, 127-142. doi:10.1007/978-1-4419-6327-7_11
- Spencer, J. L., Hibbard, B. E., Moeser, J. et Onstad, D. W. (2009). Behaviour and ecology of the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Agricultural and Forest Entomology*, 11(1), 9-27. doi:10.1111/j.1461-9563.2008.00399.x
- Stellwagen, E., Prantner, J. D. et Stellwagen, N. C. (2008). Do zwitterions contribute to the ionic strength of a solution? *Analytical Biochemistry*, 373(2), 407-409. doi:10.1016/j.ab.2007.10.038
- Tabaei, S. R., Rabe, M., Zhdanov, V. P., Cho, N. J. et Höök, F. (2012). Single vesicle analysis reveals nanoscale membrane curvature selective pore formation in lipid membranes by an antiviral alpha-helical peptide. *Nano Letters*, 12(11), 5719-5725. doi:10.1021/nl3029637
- Tabashnik, B. et Gould, F. (2012). Delaying corn rootworm resistance to Bt corn. *Journal of Economic Entomology*, 105(3), 767-776. doi:10.1603/EC12080
- Tan, S. Y., Rangasamy, M., Wang, H., Vélez, A. M., Hasler, J., McCaskill, D., Xu, T., Chen, H., Jurzenski, J., Kelker, M., Xu, X., Narva, K. et Siegfried, B. D. (2016). RNAi induced knockdown of a cadherin-like protein (EF531715) does not affect toxicity of Cry34/35Ab1 or Cry3Aa to *Diabrotica virgifera virgifera* larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 75, 117-124. doi:10.1016/j.ibmb.2016.06.006
- Tanaka, S., Miyamoto, K., Noda, H., Jurat-Fuentes, J. L., Yoshizawa, Y., Endo, H. et Sato, R. (2013). The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *FEBS Journal*, 280(8), 1782-1794. doi:10.1111/febs.12200
- Terra, W. R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47(2), 47-61. doi:10.1002/arch.1036

- Thiery, I., Back, C., Barbazan, P. et Sinègre, G. (1996). Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *B. sphaericus* dans la démoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales. *Annales de l'Institut Pasteur / Actualités*, 7(4), 247-260.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0924-4204(97)86393-7
- Tran, L. B., Vachon, V., Schwartz, J. L. et Laprade, R. (2001). Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4488-4494. doi:10.1128/AEM.67.10.4488-4494.2001
- Tzokov, S. B., Wyborn, N. R., Stillman, T. J., Jamieson, S., Czudnochowski, N., Artymiuk, P. J., Green, J. et Bullough, P. A. (2006). Structure of the hemolysin E (HlyE, ClyA, and SheA) channel in its membrane-bound form. *Journal of Biological Chemistry*, 281(32), 23042-23049. doi:10.1074/jbc.M602421200
- Vachon, V., Delisle, M.-C., Laprade, R. et Béliveau, R. (1991). Reconstitution of the renal brush-border membrane sodium/phosphate co-transporter. *The Biochemical Journal*, 278(Pt 2), 543-8.
- Vachon, V., Laprade, R. et Schwartz, J.-L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(1), 1-12. doi:10.1016/j.jip.2012.05.001
- Vadlamudi, R. K., Ji, T. H. et Bulla, L. A. (1993). A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12334-12340.
- Vadlamudi, R. K., Weber, E., Ji, I., Ji, T. H. et Bulla, L. A. (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(10), 5490-5494. doi:10.1074/jbc.270.10.5490
- Vaidyanathan, M. S., Sathyanarayana, P., Maiti, P. K., Visweswariah, S. S. et Ayappa, K. G. (2014). Lysis dynamics and membrane oligomerization pathways for cytolysin A (ClyA) pore-forming toxin. *Royal Society of Chemistry Advances*, 4(10), 4930.
doi:10.1039/c3ra45159c
- Valaitis, A. P., Lee, M. K., Rajamohan, F. et Dean, D. H. (1995). Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c) δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(10), 1143-1151. doi:10.1016/0965-1748(95)00050-X
- van Frankenhuyzen, K. (2000). Application of *Bacillus thuringiensis* in forestry. *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*, 371-376.
- van Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(1), 1-16. doi:10.1016/j.jip.2009.02.009
- Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D. et Van Mellaert, H. (1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *European Journal of Biochemistry*, 186(1-2), 239-247. doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb15201.x

- Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D. et Van Mellaert, H. (1990). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(5), 1378-1385.
- Wallace, A. J., Stillman, T. J., Atkins, A., Jamieson, S. J., Bullough, P. A., Green, J. et Artymiuk, P. J. (2000). *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell*, 100(2), 265-276. doi:10.1016/S0092-8674(00)81564-0
- Walters, F. S., Slatin, S. L., Kulesza, C. A. et English, L. H. (1993). Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) δ -endotoxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 196(2), 921-926. doi:10.1006/bbrc.1993.2337
- Wei, J.-Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S.-C. et Aroian, R. V. (2003). *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2760-2765. doi:10.1073/pnas.0538072100
- Whalon, M. E. et Wingerd, B. A. (2003). Bt: Mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54(4), 200-211. doi:10.1002/arch.10117
- Whiteley, H. R. et Schnepf, H. E. (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Microbiology*, 40, 549-576. doi:10.1146/annurev.micro.40.1.549
- Wolfersberger, M. G., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, V. F., Giordana, B. et Hanozet, G. M. (1987). Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86A, 301-308.
- Xu, C., Chinte, U., Chen, L., Yao, Q., Meng, Y., Zhou, D., Bi, L. J., Rose, J., Adang, M. J., Wang, B.-C., Yu, Z. et Sun, M. (2015). Crystal structure of Cry51Aa1: A potential novel insecticidal aerolysin-type β -pore-forming toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462(3), 184-189. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.068
- Xu, C., Wang, B.-C., Yu, Z. et Sun, M. (2014). Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins*, 6(9), 2732-2770. doi:10.3390/toxins6092732
- Yu, Z., Luo, H., Xiong, J., Zhou, Q., Xia, L., Sun, M., Li, L. et Yu, Z. (2014). *Bacillus thuringiensis* Cry6A exhibits nematocidal activity to *Caenorhabditis elegans* *bre* mutants and synergistic activity with Cry5B to *C. elegans*. *Letters in Applied Microbiology*, 58(6), 511-519. doi:10.1111/lam.12219
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Rose-Young, L. et Bulla, L. A. (2005). Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death and Differentiation*, 12(11), 1407-1416. doi:10.1038/sj.cdd.4401675